



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**VARROOSIS MÜCADELESİ İÇİN KONTROLLÜ  
TİMOL SALIM SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE  
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Onur DEMİR**

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Ali BİLGİLİ**

**ANKARA**

**2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**VARROOSIS MÜCADELESİ İÇİN KONTROLLÜ  
TİMOL SALIM SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE  
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Onur DEMİR**

**FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Ali BİLGİLİ**

**Bu araştırma Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar  
Genel Müdürlüğü tarafından TAGEM/HSGYAD/A/20/A5/P6/1943 proje  
numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA**

**2022**

## Etik Beyan

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Varroosis Mücadelesi İçin Kontrollü Timol Salım Sisteminin Geliştirilmesi ve Etkinliğinin Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı : Onur DEMİR

Tarih : 30.03 2022

İmza :

## Kabul ve Onay

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında Onur DEMİR tarafından hazırlanan “Varroosis Mücadelesi İçin Kontrollü Timol Salım Sisteminin Geliştirilmesi ve Etkinliğinin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:30.03.2022

Prof. Dr. Mehlika PULAT  
Gazi Üniversitesi  
Fen Fakültesi  
Jüri Başkanı

Prof.Dr. Ali BİLGİLİ  
Ankara Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı  
(Danışman)

Prof. Dr. Ender YARSAN  
Ankara Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

Doç.Dr. Levent ALTINTAŞ  
Ankara Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

Doç.Dr. Hüsamettin EKİCİ  
Kırıkkale Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

|                         |      |
|-------------------------|------|
| Etik Beyan              | ii   |
| Kabul ve Onay           | iii  |
| İçindekiler             | iv   |
| Önsöz                   | vi   |
| Simgeler ve Kısaltmalar | viii |
| Şekiller                | ix   |
| Çizelgeler              | xii  |

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                                         | 1  |
| 1.1. Arıcılık Faaliyetlerinin Ülkemizdeki Durumu ve Ekonomik Katkısı                    | 2  |
| 1.2. <i>Varroa</i> Akarı Biyolojisi ve Varroosis Enfestasyonu                           | 3  |
| 1.3. Varroosis Enfestasyonu ile Mücadele Çalışmaları ve Timol Kullanımı                 | 6  |
| 1.4. Timol Tayini İçin Analitik Metot ve Metot Geçerli Kılma Çalışmaları                | 12 |
| 1.5. Kontrollü Salım Sistemleri ve Timolün Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanımı      | 13 |
| 1.6. Timol Salım Düzeyinin Ölçülmesi İçin <i>in vitro</i> Salım Sistemi                 | 19 |
| 1.7. <i>In vivo</i> Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Belirleme Çalışmaları | 22 |
| 1.8. Bal ve Bal Mumunda Timol Kalıntısı Oluşumu ve Kalıntı Düzeyleri                    | 23 |
| <b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                                                               | 26 |
| 2.1. Timol Tayini İçin Analitik Metot Geliştirme ve Metodun Geçerli Kılınması           | 27 |
| 2.1.1. Timol tayini için analitik metot geliştirme çalışması                            | 27 |
| 2.1.2. Analitik metodun geçerli kılınması çalışmaları                                   | 30 |
| 2.2. Kontrollü Salım Sistemi İçin Biyouyumlu Polimerler ile Hidrojel Hazırlanması       | 39 |
| 2.2.1. Jelatin hidrojellerin hazırlanması                                               | 39 |
| 2.2.2. Na-Aljinat hidrojellerin hazırlanması                                            | 40 |
| 2.2.3. Karboksi metil selüloz hidrojellerin hazırlanması                                | 41 |

|                                                                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.3. Hidrojellerin Şişme Özelliklerinin İncelenmesi                                                                     | 42  |
| 2.4. Hidrojellerin Timol Yüklenebilme Özelliklerinin İncelenmesi                                                        | 43  |
| 2.5. Hidrojellerin Karakterizasyonu ve Morfolojisinin İncelenmesi                                                       | 44  |
| 2.5.1. Hidrojel yapısının FT-IR ile incelenmesi                                                                         | 45  |
| 2.5.2. Hidrojel yapısının taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi                                                  | 45  |
| 2.5.3. Hidrojel yapısının ışık mikroskobu ile incelenmesi                                                               | 46  |
| 2.6. <i>İn vitro</i> Salım Sisteminde Timol Salım Düzeyinin Ölçülmesi Çalışmaları                                       | 47  |
| 2.7. <i>İn vivo</i> Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Belirleme Çalışmaları                                 | 50  |
| 2.8. Bal ve Bal Mumunda Timol Kalıntı Düzeylerinin Araştırılması                                                        | 63  |
| 2.9. Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Değerlendirme Metodu                                                           | 64  |
| <b>3. BULGULAR</b>                                                                                                      | 64  |
| 3.1. Timol Tayin Metodu Geçerli Kılma Çalışması Bulguları                                                               | 65  |
| 3.2. Hidrojellerin Şişme Testi Bulguları                                                                                | 69  |
| 3.3. Hidrojellerin Timol Yüklenebilme Testi Bulguları                                                                   | 71  |
| 3.4. Hidrojellerin Karakterizasyonu ve Hidrojel Morfolojisi İnceleme Bulguları                                          | 72  |
| 3.5. Hidrojellerin Farmasötik Kalite ve Stabilite Özellikleri Bulguları                                                 | 77  |
| 3.6. <i>İn vitro</i> Salım Sisteminde Timol Salım Düzeyi Ölçüm Çalışması Bulguları                                      | 80  |
| 3.7. <i>İn vivo</i> Doz Titrasyon-Doz Doğrulama ve Akarisidal Etkinlik- Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışmaları Bulguları | 86  |
| 3.8. Bal ve Bal Mumunda Kalıntı Düzeyi Araştırma Bulguları                                                              | 90  |
| 3.9. Bulguların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi                                                                  | 92  |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                                                                                                      | 99  |
| <b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                                                                                             | 118 |
| <b>ÖZET</b>                                                                                                             | 121 |
| <b>SUMMARY</b>                                                                                                          | 122 |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                                                                        | 123 |
| <b>EKLER</b>                                                                                                            | 132 |
| <b>Ek-1. Etik Kurul Kararı</b>                                                                                          | 132 |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                                                         | 133 |

## ÖNSÖZ

Tarım sektörü ve ekosistem için önemli görevler üstlenen arıların ölümüne ve verimlerinin düşüşüne sebep olan paraziter, bakteriyel, viral ve mantar kökenli hastalıklar arıcılık sektörü bakımından büyük önem arz etmektedir. Bahsedilen verim kayıplarının en yaygın sebebi *Varroa destructor* tarafından oluşturulan varroosis hastalığıdır. Akara karşı çok sayıda mücadele yöntemi geliştirilmiş olup bunların başında kimyasal mücadele yöntemleri gelmektedir. Kimyasallar, doğru uygulama şekli, süresi ve dozajında varroosis mücadelesinde etkili olmakta ancak uygun olmayan kontrolsüz kullanımı ya da çevresel etkilerle uygulama süresi ve dozunun kontrol edilememesi sebebiyle, beklenen etkinlik elde edilememekte ve koloni sağlığı olumsuz etkilenmektedir. Bu durum antiparaziter direnç gelişimine ve arı ürünleri ile çevrede oluşan kalıntılar yoluyla da ekosistemde yer alan tüm canlıların sağlığı için olumsuzluklara sebebiyet verebilmektedir.

Kontrollü salım sistemleri (KSS) tekniği kullanılarak mevcut kimyasal maddelerle oluşturulacak formülasyonların, sağaltım süresince uygun doz ve sürelerle kolonilere uygulanması, sağaltım etkinliğin artırılması, hedef hayvan türü güvenliği ile bunun yanında gıdalarda kalıntı ve çevre güvenliğinin artırılması için çözüm potansiyeli barındırmaktadır.

Çalışma kapsamında, timol etkin maddesi ve biyoyoumlu olduğu bildirilen polimerler ile KSS oluşturularak birim etkin maddeden elde edilen akarisidal etkinlik, hedef tür hayvan güvenliği ve kalıntı bakımından timol içerikli referans ilaç arasında karşılaştırmalar yapıldı. Proje olarak gerçekleştirilen çalışmanın bütçesi, Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklendi. Çalışmada Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü yürütücü kuruluş olarak ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı ve Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Fizikokimya Anabilim Dalı iş birliği yapılan kuruluşlar olarak yer aldı.

Çalışmanın birçok aşamasında desteklerini esirgemeyen başta Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürü Dr. Fahriye SARAÇ olmak üzere Enstitü yöneticilerine, İlaç Kalite Kontrol Laboratuvarı'nda yapılan çalışmalarda desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Dr. Erdim Ozan ÇAKIR, Kimyager Mevlüt DEMİRBAŞ, Dr. Tülay ÇAM, Veteriner Hekim Muhammet ARTAN, Dr. Mustafa KESMEN, Kimya Mühendisi Farah TATAR, Veteriner Hekim Gizem KARAGÜLLE ACET, Veteriner Hekim Mustafa EKİZ ve Kimyager Pınar ERSAN'a, paraziter teşhis ile ilgili çalışmalarda emeklerini ve uzman görüşlerini esirgemeyen Doç. Dr. Taraneh ÖNCEL ve Dr. Mesut ŞENEL'e, ışık mikroskobu görüntüleme işlemlerinde yardım ve emeklerini esirgemeyen Veteriner Hekim Osman DOĞAN'a, pestisit analizlerinin gerçekleştirilmesinde emeği geçen Dr. Alper SEZGİN'e, kalıntı analizlerinin gerçekleştirilmesinde emeği geçen değerli arkadaşım Veteriner Hekim Özgen ÖZDEMİR'e, liyofilizasyon işlemleri ve elektron mikroskobu görüntüleme işlemlerinin gerçekleştirilmesinde uzman görüşlerini ve emeklerini esirgemeyen Kimyager Güler ÇELİK ve Doç. Dr. M. Akif ÇİMENOĞLU'na, *In vitro* salım sistemi kurulumunda emeği geçen Mühendis Murat YILDIRIM'a, *in vivo* çalışmaların her aşamasında desteği ve emeğini esirgemeyen İstanbul İli Arı Yetiştiricileri Birliği Başkanı Onur ÇİLENK'e, KSS geliştirme aşaması başta olmak üzere bilgi birikimi, tecrübesi ve pozitif enerjisi ile tez çalışmamın yönlendirilmesi, yürütülmesi ve sonuca ulaşabilmesi için destek olan, sunduğu farklı bakış açıları ile kendisinden çok şey öğrendiğim, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Fizikokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi değerli tez komitesi üyem Prof. Dr. Mehlika PULAT'a, başta değerli danışmanım Prof. Dr. Ali BİLGİLİ ve değerli arkadaşım Dr. Sedat SEVİN olmak üzere doktora öğrenim programım başından itibaren emeği ve desteğini esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine, tüm hayatım boyunca sevgisini, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her koşulda destekleyen ailem ve eşime, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından TAGEM/HSGYAD/A/20/A5/P6/1943 kodu ile desteklenmiştir.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                  |                                                                                                       |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ADI              | Günlük Alım Limiti                                                                                    |
| AOAC             | Resmi Tarım Kimyagerleri Derneği                                                                      |
| CMC              | Karboksi Metil Selüloz                                                                                |
| EMA              | Avrupa İlaç Ajansı                                                                                    |
| E.P.             | Avrupa Farmakopesi                                                                                    |
| FDA              | Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi                                                      |
| FT-IR            | Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi                                                           |
| GABA             | Gama Amino Bütirik Asit                                                                               |
| HPLC-DAD         | Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi - Diyot Dizinli Dedektör                                            |
| ICH              | Uluslararası Beşeri Kullanıma Yönelik Farmasötiklerin Teknik Gerekliliklerini Uyumlaştırma Konferansı |
| KSS              | Kontrollü Salım Sistemi                                                                               |
| LOD              | Tespit Limiti                                                                                         |
| LOQ              | Ölçüm Limiti                                                                                          |
| MKL              | Maksimum Kalıntı Limiti                                                                               |
| MİK              | Minimum İnhibitör Konsantrasyon                                                                       |
| OIE              | Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü                                                                           |
| ÖD <sub>50</sub> | Ortalama Öldürücü Doz                                                                                 |
| SEM              | Taramalı Elektron Mikroskobu                                                                          |
| SPE              | Katı Faz Özütleme                                                                                     |
| TEDB             | Tespit Edilebilir Düzeyde Bulunamadı                                                                  |
| TRP              | Geçici Reseptör Potansiyeli İyon Kanalı                                                               |
| TRPL             | Geçici Reseptör Potansiyeli Benzeri İyon Kanalı                                                       |
| VICH             | Veteriner Tıbbi Ürünler İçin Teknik Gerekliliklerin Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı              |

## ŞEKİLLER

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.1.</b> <i>Varroa</i> Akarı, İşçi Arı ve Erkek Arının Kuluçka Gözlerinde Gelişimi            | 5  |
| <b>Şekil 1.2.</b> Rezervuar KSS ve Matriks KSS Yapıları                                                | 17 |
| <b>Şekil 2.1.</b> Arılık Bölgesi Genel Görünümü                                                        | 52 |
| <b>Şekil 2.2.</b> Doz Titrasyonu ve Doz Doğrulama Çalışması Aşamaları                                  | 59 |
| <b>Şekil 2.3.</b> Akarisidal Etkinlik ve Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışması Aşamaları                 | 61 |
| <b>Şekil 2.4.</b> Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışması Görselleri                   | 61 |
| <b>Şekil 3.1.</b> Timol Doğrusallık Grafiği                                                            | 66 |
| <b>Şekil 3.2.</b> A- Timol ve p-cumenol (10 µg/mL), B- Timol (5-10-15 µg/mL) HPLC-DAD kromatogramları. | 68 |
| <b>Şekil 3.3.</b> Hidrojel Numunesi HPLC-DAD Kromatogramı                                              | 69 |
| <b>Şekil 3.4.</b> Jelatin Hidrojelleri % Şişme-Zaman Grafiği                                           | 69 |
| <b>Şekil 3.5.</b> Jelatinin Çapraz Bağlanma Öncesi ve Sonrası FT-IR Spektrumları                       | 72 |
| <b>Şekil 3.6.</b> Plasebo ve Test Hidrojellerinin FT-IR Spektrumlarının Karşılaştırılması              | 72 |
| <b>Şekil 3.7.</b> Plasebo Hidrojeli SEM Görüntüsü                                                      | 73 |
| <b>Şekil 3.8.</b> Test Hidrojeli SEM Görüntüsü                                                         | 74 |
| <b>Şekil 3.9.</b> Plasebo Hidrojeli Işık Mikroskobu Görüntüsü                                          | 76 |
| <b>Şekil 3.10.</b> Test Hidrojeli Işık Mikroskobu Görüntüsü                                            | 76 |
| <b>Şekil 3.11.</b> Saf Timol <i>in vitro</i> Kümülatif Salım Timol Konsantrasyon-Zaman Grafiği         | 79 |
| <b>Şekil 3.12.</b> Saf Timol Kovan İçerisi Hava Timol Konsantrasyonu-Zaman Grafiği                     | 80 |
| <b>Şekil 3.13.</b> Referans İlaç <i>in vitro</i> Kümülatif Salım Timol Konsantrasyonu-Zaman Grafiği    | 81 |
| <b>Şekil 3.14.</b> Referans İlaç Kovan İçerisi Hava Timol Konsantrasyonu-Zaman Grafiği                 | 81 |

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 3.15.</b> Hidrojel <i>in vitro</i> Kümülatif Salım Timol Konsatrasyonu-Zaman Grafiği                            | 82 |
| <b>Şekil 3.16.</b> Hidrojel Kovan İçi Hava Timol Konsantrasyonu-Zaman Grafiği                                            | 82 |
| <b>Şekil 3.17.</b> Hidrojel <i>in vitro</i> Salım Kovan İçi Hava Timol Konsantrasyonu-Zaman Grafiği (1/5 Ölçeklendirme)  | 84 |
| <b>Şekil 3.18.</b> Hidrojel <i>in vitro</i> Salım Kovan İçi Hava Timol Konsantrasyonu-Zaman Grafiği (1/10 Ölçeklendirme) | 85 |
| <b>Şekil 3.19.</b> Doz Titrasyon ve Doz doğrulama Çalışması Sıcaklık-Nem Ölçümleri                                       | 86 |
| <b>Şekil 3.20.</b> Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Çalışması Sıcaklık-Nem Ölçümleri                               | 89 |



## ÇİZELGELER

|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 2.1.</b> Jelatin Hidrojeli Hazırlama Koşulları                                                                                             | 41 |
| <b>Çizelge 2.2.</b> <i>İn vivo</i> Çalışmalar Öncesi Kolonilerden Alınan ve A.TOK.16 Metodu ile Arı, Bal ve Bal Mumu Örneklerinde Taranan Pestisitler | 56 |
| <b>Çizelge 3.1.</b> Jelatin Hidrojelleri % Şişme, Yapı Görünümü-Sağlamlık Değerlendirmesi                                                             | 70 |
| <b>Çizelge 3.2.</b> Jelatin Hidrojeli % Timol Yüklenebilme Düzeyi, Yapı Görünümü- Sağlamlık Değerlendirmesi                                           | 71 |
| <b>Çizelge 3.3.</b> Hidrojellerin Hacim/Kütle Tek Düzeliği Testi Bulguları                                                                            | 78 |
| <b>Çizelge 3.4.</b> Hidrojellerin İçerik Tek Düzeliği Testi Bulguları                                                                                 | 79 |
| <b>Çizelge 3.5.</b> Hidrojellerin Stabilite Kontrol Testi Bulguları                                                                                   | 79 |
| <b>Çizelge 3.6.</b> Doz Titrasyon-Doz Doğrulama Çalışması Akarisidal Etkinlik Bulguları                                                               | 86 |
| <b>Çizelge 3.7.</b> Doz Titrasyon-Doz Doğrulama Çalışması Hedef Tür Tolerans Düzeyi Bulguları                                                         | 87 |
| <b>Çizelge 3.8.</b> <i>İn vivo</i> Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışması Sağaltım Grupları-Akarisidal Etkinlik Düzeyi Bulguları     | 88 |
| <b>Çizelge 3.9.</b> <i>İn vivo</i> Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışması, Sağaltım Grubu-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Bulguları        | 89 |
| <b>Çizelge 3.10.</b> Timol Uygulanan Kolonilerde Bal ve Bal Mumunda Timol Kalıntı Düzeyi Araştırma Bulguları                                          | 91 |
| <b>Çizelge 3.11.</b> <i>İn vivo</i> Çalışmalarda Elde Edilen Verilerin Normal Dağılım Testi Sonuçları                                                 | 92 |
| <b>Çizelge 3.12.</b> Doz Titrasyon Doz Doğrulama Çalışması Akarisidal Etkinlik Verilerinin İstatistiksel Analizi                                      | 93 |
| <b>Çizelge 3.13.</b> Doz Titrasyon-Doz Doğrulama Çalışması Hedef Tür Tolerans Verilerinin İstatistiksel Analizi                                       | 94 |
| <b>Çizelge 3.14.</b> Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışması Akarisidal Etkinlik Verilerinin İstatistiksel Analizi                    | 95 |

|                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 3.15.</b> Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışması, Hedef Tür Tolerans Verilerinin İstatistiksel Analizi | 96 |
| <b>Çizelge 3.16.</b> Balda Timol Kalıntısı Çalışma Verilerinin İstatistiksel Analizi                                               | 97 |
| <b>Çizelge 3.17.</b> Bal Mumunda Timol Kalıntısı Çalışma Verilerinin İstatistiksel Analizi                                         | 98 |



# 1. GİRİŞ

Gerek tarım sektörü gerek ekosistem için önemli görevler üstlenen arıların verimlerinin düşüşüne veya ölümlerine sebep olan paraziter, bakteriyel, viral ve mantar kökenli hastalıklar sektör bakımından önem arz etmektedir (Balkaya ve ark., 2016). Ölüm ve verim kayıplarının en yaygın sebebinin, *Varroa destructor* adı verilen arı akarı tarafından oluşturulan varroosis enfestasyonu olduğu bildirilmektedir (Ayan ve ark., 2017; Balkaya ve ark., 2016 ve Harris ve ark., 2019). Üreme, gelişme ve çoğalma dönemlerinin tümünü sadece bal arısı kolonilerinde gerçekleştirebilmesi nedeniyle zorunlu parazitismus özelliği gösteren *Varroa* akarı gerekli önlem alınmadığında hızla çoğalarak kolonilerin verimlerinin düşmesine ya da koloni bireylerini zayıf düşürerek diğer hastalıklara karşı daha duyarlı hale gelmesine, ileri aşamalarda ise kolonilerin tamamen sönmesine varan zararlara neden olmaktadır. Akara karşı çok sayıda mücadele yöntemi geliştirilmiş olup bunların başında kimyasal mücadele yöntemleri gelmektedir. Kimyasallar, doğru uygulama şekli, süresi ve dozajında varroosis mücadelesinde etkili olmakta ancak uygun olmayan kontrolsüz kullanımı ya da çevresel etkilerle uygulama süresi ve dozunun kontrol edilememesi sebebiyle, beklenen etkinlik elde edilememekte ve koloni sağlığı olumsuz etkilenmektedir. Bu durum diğer yandan şekillenecek antiparaziter direnç gelişimi ile kısıtlı mücadele seçeneklerinin azalmasına ve arı ürünleri ile çevrede oluşan kalıntılar yoluyla da ekosistemde yer alan tüm canlıların sağlığı için olumsuzluklara sebebiyet verebilmektedir (Akyol ve Özkök, 2005; Daş ve Aksoy, 2015 ve Tihelka, 2018). Ruffinengo ve ark. (2014), uçucu yağların, sentetik pestisitlere göre çevre için daha az riskli olduğu ve bileşenlerin karmaşıklığı nedeniyle direncin daha yavaş geliştiği, mikrokapsülleme yoluyla uçucu yağların performansının artırılabilceği, aynı zamanda uçuculuğu, suda yetersiz çözünme ve oksitlenme yeteneği ile ilgili olumsuz etkilerin de azaltılabileceği, bu bağlamda çalışmanın, bal arısı kolonilerinde gelecekteki entegre akar mücadelesi uygulamalarına iyi bir alternatif sunduğundan, *Acantholippia seriphoides* ve *Schinus molle* L. üzerinde yürüttükleri araştırmalarının diğer esansiyel yağların mikrokapsülleme araştırmaları için bir başlangıç noktası

olabileceği görüşünü paylaşmışlardır. Moretti ve ark. (2002), jelatin kullanarak, farklı kimyasal bileşenlere sahip olan *Rosmarinus officinalis* ve *Thymus herbarona* uçucu yağları ile yüksek mikrokapsülleme verimleri elde etmişlerdir. Çalışmalarının sonunda daha az miktarlarda pestisit belirlenen bir zaman aralığında daha etkin kullanılmasına izin veren KSS'nin, uygulama kolaylığı sağlaması ve çevresel hasarı en aza indirmek bakımından iyi bir seçenek oluşturduğunu belirtmişlerdir. KSS tekniği kullanılarak mevcut kimyasal maddelerle oluşturulacak formülasyonların, sağaltım süresince uygun doz ve sürelerle kolonilere uygulanması, sağaltım etkinliğinin artırılması, hedef hayvan türü güvenliği ile bunun yanında gıdalarda kalıntı ve çevre güvenliğinin artırılması için çözüm potansiyeli barındırmaktadır. Bu çalışmada, timolün biyoyumlu olduğu bildirilen polimerler ve hidrojel tekniği ile oluşturulan KSS'nin varroosis mücadelesinde kovan içi hava ortamına timol salımı yoluyla kullanımı, sistemin oluşturduğu akaricidal etkinlik, hedef tür arılarda tolerans düzeyleri ve bal ile bal mumunda timol kalıntı düzeyleri bakımından timol içerikli referans ilaçla karşılaştırılması, KSS ve mevcut ilaç formülasyonları ile yapılan uygulamalar arasında olası fark ve düzeyinin araştırılması amaçlandı.

### **1.1. Arıcılık Faaliyetlerinin Ülkemizdeki Durumu ve Ekonomik Katkısı**

Hayvansal üretimin önemli bir alt dalı olan arıcılık; ülkemizin, sahip olduğu geniş arazi ve endemik türlerle birlikte zengin bitki örtüsü, birçok arı ırkı için uygun iklim çeşitliliği ve mevcut koloni varlığı bakımından önemli bir gelir ve geçim kaynağıdır. 2020 yılı verilerine göre ülkemizde 82 845 arıcılık işletmesi ve 8 179 085 kovan bulunmakta olup 104 077 ton bal ve 3 765 ton bal mumu üretimi gerçekleştirildi (Anon, 2021c). Bunun dışında sanayide ve çeşitli yerlerde kullanılan arı sütü, polen, arı zehiri ve propolis gibi arıcılık ürünleri de üretilmektedir.

Bal arısı, sağlamış olduğu bu ürünlerin yanında asıl olarak bitkilerdeki tozlaşmayı gerçekleştirerek tarım ürünlerinin nicelik ve nitelik yönünden üstün olmasını sağlamaktadır (Daş ve Aksoy, 2015; Fıratlı ve ark., 2010 ve Semerci, 2017). Dünya genelinde arı tozlaşması ile elde edilen gelirin, ürün çeşitliliğine bağılı olarak o yıl üretilen balın değerin 50 ila 143 katından fazla olduğu belirtilmektedir. Türkiye ekonomisi bakımından, doğrudan 160 milyon TL, dolaylı olarak 1,6-2,4 milyar TL getirisi ile arıcılık faaliyetlerinin ülkemiz tarımında önemli bir konuma sahip olduğunu göstermektedir (Daş ve Aksoy, 2015; Semerci, 2017).

## 1.2. *Varroa* Akarı Biyolojisi ve Varroosis Enfestasyonu

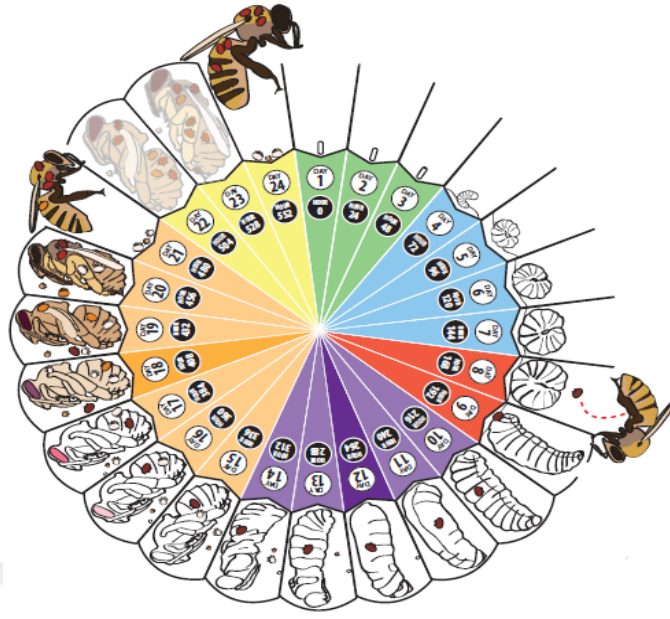
Varroosis ya da varroatosis; *Varroa destructor* akarı tarafından bal arısı kolonilerinin istila edilmesi, erişkin ve yavru arıların hemolenfleriyle beslenerek kolonide çeşitli zararların oluşumu ile seyreden arıların dış paraziter hastalığıdır. *Varroa destructor* erişkin dişisi ortalama 1,1 mm uzunluk ve 1,5 mm genişlikte elips bir şekilde, kırmızımsı kahverengi renklerde ve dört çift bacaklıdır. Erkeğı ortalama 0,8 mm çapında küresel şekilli vücut yapısında ve beyazımsı renktedir. Erkek *Varroa* sadece üremenin gerçekleştiğı yavrulu kuluçka gözlerinde üreme görevini gerçekleştirmesinin ardından birkaç gün içinde beslenemedikleri için ölmektedirler (Anon, 2015).

Akar ülkemizde ilk olarak 1976 yılında Trakya Bölgesi'nde, 1977-78 yıllarında Ege Bölgesi'nde görüldü, bu bölgelere gelen gezginci arıcılar vasıtasıyla da 4-5 yıl gibi çok kısa bir süre içerisinde tüm ülkeye yayıldı (Balkaya ve ark., 2016). Ülkemizde farklı bölgelerden alınarak incelenen *Varroa* akar örnekleri hem morfolojik hem de genetik incelemelerinde *V. destructor*'un Kore genotipi olarak tespit edildiğı, varroosis için %6,2-100 arasında değışen prevalansların belirlendiğı bildirildi (Aydın ve Girişgin, 2010). *V. destructor*'un Kore genotipi en çok yaygınlık gösteren ve en zararlı genotipidir (Rosenkranz ve ark., 2009).

V. *destructor*'un konakçı bulma, üreme davranışı ve popülasyon dinamiklerini anlamak kontrol yöntemlerinin geliştirilmesi için çok önemlidir. Akar yaşam döngüsü bal arısına bağımlıdır ve arılar dışında serbest bir yaşam evresine sahip değildir. Dişi akarın yetişkin arılarda foretik faz ve kuluçka petek gözlerinde üreme fazı olmak üzere yaşam döngüsü iki fazlıdır. Akarların erkekleri ve nimfal evreleri kısa ömürlüdür ve sadece mühürlü kuluçka hücreleri içinde bulunmaktadır (Rosenkranz ve ark., 2009).

Akarın koloniye bulaşması, çiçek tozu ve nektar toplarken arıdan arıya bulaşma, kolonilerin birbiri ile birleştirilmeleri yoluyla bulaşma ve koloniler arası soygun davranışları sonucu bulaşma şeklinde olmaktadır (Akyol ve Özkök, 2005 ve Blacquiére ve ark., 2017).

Koloniye taşınan erişkin akar kış aylarında olduğu gibi kuluçka bulunmadığı dönemlerde yetişkin arıların baş, göğüs ve karın bölgelerine tutunmakta, arının hemolimfinden beslenerek yüz günden fazla yaşayabilmektedir (Harris ve ark., 2019). Akarın üreme fazı, İlkbaharda arı larvalarının gelişmesiyle birlikte başlamakta ve Sonbaharda son genç işçi arılar çıkıncaya kadar devam etmektedir (Akyol ve Özkök, 2005). Yetişkin dişi akar, işçi arı ve erkek arı kuluçka gözlerine girerek yaklaşık otuz saatlik aralıklarla dört veya beş yumurta bırakmaktadır. İlk yumurta genellikle bir erkeğe, daha sonrakiler de dişilere dönüşmektedir. Yetişkin dişi akarın bıraktığı yumurta larva, protonimf, deutonimfe evrelerini takip ederek genç yetişkin bir akara gelişimi işçi arı kuluçka gözlerinde yirmi bir günde, erkek arı kuluçka gözlerinde yirmi dört günde tamamlanmaktadır. Dişi akarlar, kuluçka hücrelerinden çıktıktan sonra foretik faza geçiş yapıp erişkin arıların hemolenf ile beslenmekte ve yaklaşık yedi gün içinde başka bir kuluçka hücrelerine girerek üreme döngüsünü sürdürmektedir (Anon, 2015 ve Harris ve ark., 2019).



- Arı Yumurtası Evresi
- Enfestasyon Öncesi Arı Larva Evresi
- Anne *Varroa* Akarının Kuluçka Gözüne Girişi
- Arı Pupa Öncesi Evre
- İlk *Varroa* Akarı Yumurtası
- Arı Pupa Evresi
- Erkek *Varroa* Akarının Üreme Yeteneği Kazanması
- Dişi Arıların ve Erkek Arıların Kuluçka Gözünden Çıkışı

- Anne *Varroa* Akarı
- *Varroa* Akarı Yumurtası
- Erkek *Varroa* Akarı Proto/Deutonimf
- Dişi *Varroa* Akarı Protonimf
- Dişi *Varroa* Akarı Deutonimf
- Erişkin Erkek *Varroa* Akarı
- Genç Yetişkin Dişi *Varroa* Akarı
- Yetişkin Dişi *Varroa* Akarı

**Şekil 1.1.** *Varroa* Akarı, İşçi Arı ve Erkek Arının Kuluçka Gözlerinde Gelişimi (Evans ve Cook, 2018).

*Varroa* akarları enfeste ettikleri bal arısı kolonilerinde erişkin arıların hemolenfleri ile beslenmeleri nedeni ile zayıf düşmelerine, verimlerinin azalmasına, ömürlerinin kısılmasına, diğer hastalıklara karşı dirençlerinin azalmasına neden olmaktadır. Kuluçka gözlerinde hemolenfini emdikleri yavru arılarda ölüme veya kısa karın, şekli bozulmuş kanatlar ve ayaklar gibi hasarlar oluşturarak yetersiz gelişmiş bireylerle güçsüz kolonilerin oluşmasına sebep olmaktadır. Ancak akarların muhtemelen koloniler için oluşturdukları ve sağaltımı mümkün olmayan en ciddi hasar zararlı virüsleri kolonilere bulaştırmasıdır. Özellikle deforme olmuş kanat virüsünün (DWV) çoğu koloniyi öldürdüğü bildirilmektedir (Harris ve ark., 2019).

### **1.3. Varroosis Enfestasyonu ile Mücadele Çalışmaları ve Timol Kullanımı**

Varroosis mücadelesinde denenen mevcut teknik ve kimyasallarla arı kolonilerine zarar vermeden tüm parazitlerin ortadan kaldırılamadığı, bu sebeple eldeki mevcut kimyasal mücadele seçeneklerinin etkin kullanımı ile, parazit popülasyonlarının sürekli olarak yönetilmesi gerektiği gerçeğine dayanan Entegre Zararlı Yönetimi adında bir anlayış geliştirildiği bildirilmektedir. Bu mücadele yönteminde akar popülasyonları kolonilerde kabul edilebilir bir patojenite ya da diğer bir deyişle ekonomik olarak zarar oluşturabilecek bir eşiğin üzerine çıktığında kimyasal mücadele uygulanmasını ve tekrardan akar popülasyonunu kabul edilebilir seviyelere indirmeyi amaçlamaktadır. Böylece kimyasalların kullanımının azaltılması, arıcılık ürünlerindeki kalıntı düzeylerinin sınırlandırılması, akarlar tarafından kimyasallara karşı direnç gelişiminin geciktirilmesi ve ayrıca arıların potansiyel olarak zararlı kimyasallara maruz kalmasının da azaltılması hedeflenmektedir (Harris ve ark., 2019).

Toplamda 25 000 ila 34 000 yetişkin arıdan oluşan bir kolonide, erişkin arılardaki akar yükü %2 olduğunda temkinli davranılarak kimyasal mücadele

yapılmasının yerinde olacağı, yapılmadığı takdirde akar popülasyonun kısa sürede çok fazla üremesi sebebiyle erişkin arılarda toplam akar yükün %5 olan ekonomik zarar eşiğini aşacağı ve acilen kimyasal mücadele yapılması gerektiği bildirilmektedir (Harris ve ark., 2019).

Varroosis mücadelesinde fiziksel, kimyasal, biyolojik yöntemler yanında hastalığa dirençli ırkların geliştirilmesi için genetik kontrol çalışmaları yürütülmektedir. Pratikliği ve akar istilasını ekonomik zarar eşiğinin altında tutmadaki etkinliği bakımından en yaygın kullanılan yöntem kimyasal mücadele olup, uygulamalarda organik asitler, uçucu yağlar ve sentetik akarisitler kullanılmaktadır (Akyol ve Özkök, 2005).

Dünyada en yaygın kullanılan akarisidal etkili kimyasal maddeler ve antiparaziter direnç durumları incelendiğinde; amitraz, koumafos, flumetrin, fluvalinate için direnç tanımlandığı, ancak formik asit ve okzalik asit için henüz bir direnç tanımlanmadığı bildirilmektedir (Thielka, 2018). 1980’li yıllardan bu yana kullanılan timol için ise bir direnç vakası bildirilmektedir (Plettner ve ark., 2017).

Timol, doğal olarak başlıca *Lamiaceae* ailesindeki bitkilerde oluşan ve bitki yağında değişen oranlarda bulunan  $C_{10}H_{14}O$  formülüne sahip monosiklik fenolik bir bileşiktir. Normal şartlar altında beyaz veya renksiz kristalize toz haldedir. Suda çözünürlüğü düşük (0,9 g/L 20 °C), organik çözücülerde (1 g/mL alkol 25 °C) yüksektir. Erime noktası (51,5 °C) ve buhar basıncı (0,016 mm Hg 25 °C) düşük olması nedeniyle uçuculuk özelliği yüksektir (Anon, 2018b).

Timol kolay süblimleşme özelliği nedeni ile saf toz halinde veya jel, ped, şerit gibi farmasötik formülasyonlarla akarisidal olarak foretik fazdaki erişkin *Varroa* akarlarına karşı mücadelede kullanılmaktadır (Anon, 2001).

Timol ve diğer monoterpenoitler ve ilgili aromatik bileşikler akarlar ve arılarda dahil olduğu bazı böcekleri de içeren geniş spektrumda etki gösterirler. Arılarda ve akarlarda; muhtemelen GABA<sub>A</sub> reseptörlerini, TRP ve TRPL kanallarını, Tiramin ve / veya Oktopamin reseptörlerini etkilediği bildirilmektedir (Blenau ve ark., 2011).

Timolün GABA (γ-aminobütirik asit) reseptörlerini güçlendirdiği ve GABA kapılı klorür kanalının bloke edilmesinin nöronal inhibisyonu azalttığı, bunun da merkezi sinir sisteminin aşırı uyarılmasına, konvülsiyonlara ve nihai ölüme yol açtığı bildirilmektedir (Bisrat ve Jung, 2020).

Timolün, akarisidal etkinliğin yanında hedef hayvan türü olan bal arılarının güvenliğinin de sürdürülebilmesi bakımından kolonilerde kullanılması için doz-yanıt ilişkisinin ve uygulama süresinin belirlenmesi gereklidir. Bu amaçla Gashoutl ve Guzman (2009) tarafından yapılan çalışmada timol etkin maddesi için toksisite ve ÖD<sub>50</sub> (ortalama öldürücü doz) değerleri araştırıldı. Timolün 0,75 mg/flakon dozunda %100 akar mortalitesi oluşturduğu ve *V. destructor* için ÖD<sub>50</sub> değerinin 56,1 µg olduğu bildirildi. Timolün topikal uygulamasında ise yetişkin işçi arı için 210,3 µg, arı larvası için 150,7 µg ÖD<sub>50</sub> değerleri tespit edildi.

Laboratuvar koşullarında uçucu bileşenlerinin hava konsantrasyonları ile bunların akarlar ve arılar üzerindeki toksik etkileri arasındaki doz-yanıt ilişkisini belirlemek için gerçekleştirilen bir çalışmada timolle yapılan 72 saatlik test sırasında iyi bir akarisidal etkisi (> %80) ve düşük arı toksisitesi (< %20) için hava konsantrasyon aralığı 5-15 µg/L olarak tespit edildi (Imdorf ve ark., 2006).

Timolün, *V. destructor*'un kontrolü için dünya çapında bilinen en etkili doğal akarisidal olduğu, akarisidal konsantrasyonunun hem laboratuvar (Imdorf ve ark.,

1995) hem de saha koşullarında (Imdorf ve ark., 1994) benzer olduğu bildirildi. Araştırmacılar uçucu yağların ve bileşenlerini kullanmaları durumunda, akar toksisitesi ve hedef tür olan bal arıları için uygun güvenilirlik düzeylerini belirlemek için, arı kolonilerinde test edilmeden önce laboratuvar koşullarında test edilmesini önermektedirler (Imdorf ve ark., 2006).

Arılar üzerindeki olumsuz etkileri değerlendirildiğinde; aşırı süblimleşmeye neden olan yüksek çevre sıcaklıklarında huzursuzluk, kovana besin taşıma oranında azalma, erkek arılarda spermatazon düzeyinin azalması ve koloni kaybına varan hasarlara yol açmakta, düşük seviyede salımında ise salımında ise yeterli akarisidal etkinlik şekillenememektedir (Anon, 2001 ve Thielka, 2018).

Hedef tür dışındaki türlerdeki toksisitesi bakımından insanlarda timolün tek olarak veya farklı maddelerle kombine halde preparatlarda bir bileşen olarak, geniş kullanımı göz önüne alındığında, sadece nadir durumlarda primer cilt tahrişine ve hassasiyetine yol açtığı, ÖD<sub>50</sub>: Rat - 980 mg/kg (oral); 100 mg/kg (dermal) düzeyinde olduğu bildirilmektedir. Timolün toprakta, yaklaşık bir ayda önemli derecede etkisizleşmesi, biyolojik olarak kolayca parçalanabileceğini göstermektedir. Suda, timolün nehir ve göl için tahmini volatilizasyon yarı ömürleri sırasıyla 13 ve 98 gündür. Sucul canlılarında (*Daphnia magna*, *Gammarus fasciatus*, *Pimephales promelas*) ÖD<sub>50</sub> değeri 3200 µg/L 96 saat seviyesindedir (Anon, 2018b).

Kalıntı bakımından değerlendirildiğinde; AB'de timol, grup II toksik olmayan bir veteriner ilacı olarak sınıflandırılmaktadır ve maksimum kalıntı limiti (MKL) gerektirmediği bildirilmektedir (Anon, 2018c; Mutinelli, 2003 ve Mutinelli, 2016). İsviçre'de, timolün balda tat kalıntısına sebep olabilen 1,1 mg/kg kalıntı eşiğinin aşılması için 0,8 mg/kg düzeyinde bir limit uygulanmaktadır (Anon, 2001).

Toz timol ile farklı bölgeler, farklı miktar, farklı uygulama süresi, farklı kovan türleri, kovan içerisinde farklı uygulama yeri ve yıl içerisinde farklı zamanlarda yapılan varroosis mücadelesi çalışmalarında ortalama etkinliklerin %66-98 arasında değiştiği, çerçevelerin üzerine ve özellikle petri kutusu içerisinde timol yerleştirilerek yapılan uygulamalarda akarisidal etkinliğin daha fazla olduğu bildirilmektedir. Porlu seramik taşıyıcı ile oluşturulan, içeriğinde %76 oranında timol bulunan ticari preparat ApilifeVar® ile yapılan çalışmalarda ise %66,4-99,5 aralığında akarisidal etkinlik şekillendiği bildirilmektedir (Imdorf ve ark., 1999).

Apiguard® adlı ilaçla farklı bölge, farklı zaman ve çevre sıcaklıklarında, 2 haftalık aralıklarla art arda 2 kez 50 g (%25 Timol) jel kolonilere 30 ila 45 gün süresince uygulandı. Etkinliğin %74-99 aralığında değişim gösterdiği bildirilmektedir. Arıların ürüne gösterdikleri toleransın önerilen dozlarda kullanımda iyi olduğu ancak kolonide huzursuzluk oluşumunu engellemek için ürünün temas yüzeyinin artırılmaması gerektiği vurgulanmaktadır (Trouiller, 2004).

Apiguard®, ApilifeVar®, Thymovar® adları ile piyasada bulunan timol içerikli preparatların farklı ülkelerde *Varroa* akarı öldürücü etkinlikleri ile ilgili yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda; Kuzey, Orta ve Güney İtalya olmak üzere üç farklı bölgede gerçekleştirildiğinde Orta ve Güney’de, bütün preparatların (5-15 µg/L kovan havası düzeyinde, %90 üzeri etkinlik) yüksek etki gösterdiği, Kuzey’de Apiguard® adlı ürünün daha az etkinlik (< 4 µg/L kovan havası, %69 etkinlik) gösterdiği belirtildi. Almanya’da yapılan benzeri çalışmalarda da ılıman iklimli bölgede timol içeren preparatların hepsinin benzer etkinlik gösterdiği ancak soğuk iklimli bölgelerde Apiguard® adlı formülasyonun çevre sıcaklıklarındaki değişimlerden daha fazla etkilenecek daha az buharlaşma sonucu düşük etkinlik gösterdiği tespit edildi. Her üç preparattan, ApilifeVar®’ın çevre koşullarına en bağımsız etkin madde salımı ve tüm bölgelerde %90 üzerinde etkinlik gösterdiği, bunun ise diğer formülasyonlardan farklı olarak ApilifeVar®’ın içerdiği mentol, okaliptol ve kâfur nedenli düşük sıcaklıklarda da sıvı halde kalabilmesi, timolün

erime noktasını düşürmesi ve bu şekilde buharlaşmayı kolaylaştırmasından kaynaklanabileceği görüşü paylaşıldı (Garrido, 2018).

Cezayir’de, *Varroa* ile mücadelede onaylı iki timol preparatı (Thymovar® ve Apiguard®) *Varroa* enfestasyonu ve arı kolonilerindeki yan etkileri ile ilgili değerlendirildiğinde, her iki sağaltım için koloniler arasındaki etkinlikte geniş bir varyasyon kaydedildi. ½ şerit Thymovar® ile ardışık iki uygulama için ortalama etkinlik %84,43 olarak gerçekleşti, 2x25 g şeklindeki iki hafta aralıklı Apiguard® uygulaması için, ortalama etkinlik %81, bir hafta arayla 2x25 g uygulama için %79 etkinlik tespit edildi. Araştırmacılar çalışmalarda olağan dışı şekilde yüksek arı ölümleri kaydedilmediğini bildirmektedirler (Noureddine ve Haddad, 2016).

Qodratollah ve ark. (2017), çalışmalarında çeşitli doğal *Varroa* öldürücü bileşikler ve uygulama sistemleri kombinasyonunun, *Varroa* akarlarının seviyesini düşürmedeki etkinliğinde önemli bir değişkenlik gösterdiğini tespit ettiler. Kovanlarda, elektrikli buharlaştırıcılar ile timol etkin maddesinin kaynağı olan kekik yağını sürekli olarak buharlaştırmak için tasarlanan sistemle uygulandıklarında yüksek düzeyde (%97), çözücüler içinde seyreltilen kekik yağını hızlı bir şekilde buharlaştırmak için tasarlanan pedler yardımıyla uygulandıklarında en düşük akar kontrolü oranının (%58) görüldüğünü bildirmektedirler. Araştırmacılar her iki sağaltım şeklinde kovanlardaki arı mortalite değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadığı, kullanılan *Varroa* öldürücü maddelerin etkinliğinin, dağıtım sistemlerine yüksek oranda bağlı olduğu, kontrollü ve sürekli buharlaşma-salım sağlayan sistemlerinin varroosis ile mücadelede daha etkin olduğu sonucunu paylaşmaktadırlar.

Ruffinengo ve ark. (2014), uçucu yağların, sentetik pestisitlere göre çevre için daha az riskli olduğu ve bileşenlerin karmaşıklığı nedeniyle direncin daha yavaş geliştiği, mikrokapsülleme yoluyla uçucu yağların performansının artırılacağı, aynı zamanda uçuculuğu, suda yetersiz çözünme ve oksitlenme yeteneği ile ilgili

olumsuz etkilerin de azaltılabileceği, bu bağlamda çalışmalarının, bal arısı kolonilerinde gelecekteki entegre akar mücadelesi uygulamalarına iyi bir alternatif sunduğundan, *Acantholippia seriphioides* ve *Schinus molle L.* üzerinde yürüttükleri araştırmalarının diğer esansiyel yağların mikrokapsülleme araştırmaları için bir başlangıç noktası olabileceğini bildirmektedirler.

Moretti ve ark. (2002), jelatin kullanarak, farklı kimyasal bileşenlere sahip olan *Rosmarinus officinalis* ve *Thymus herba-barona* uçucu yağları ile yüksek mikrokapsülleme verimleri (> %98) elde ettiklerini, çalışmalarının sonunda daha az miktarlarda pestisit belirlenmesi için belirli bir zaman aralığında daha etkin kullanılmasına izin veren kontrollü salım formülasyonlarının, uygulama kolaylığı sağlaması ve çevresel hasarı en aza indirmek bakımından iyi bir seçenek oluşturduğunu belirtmektedirler.

#### **1.4. Timol Tayini İçin Analitik Metot ve Metot Geçerli Kılma Çalışmaları**

Yüksek basınçlı sıvı kromatografi, ilaç endüstrisinde etkin ve yardımcı maddelerin kalitatif ve kantitatif ölçümlerinde yaygın olarak kullanılan kalite kontrol tekniklerinden biridir. Timol etkin maddesi ultraviyole ışığa karşı belli bir spektrumda absorpsiyon yapan kromofor gruplara sahiptir. Bu özellik yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) ve diyot dizinli dedektör (DAD) sistemleri ile timolün kalitatif ve kantitatif tayinine izin vermektedir. Bu sistemlerin KSS geliştirme aşamalarında (Ramos ve ark., 2014 ve Ramos ve ark., 2020) ve hava ortamında bulunan (Imdorf ve ark., 1994 ; Imdorf ve ark., 1995; Rushworth ve ark., 2014 ve Xie ve ark., 2019) timolün miktar tayini için kullanıldığı bilinmektedir.

Timol miktarının kalitatif ve kantitatif tayini ile ilgili literatürde (Angelo ve ark., 2016; Aybastır ve Demir 2017; Dedic ve ark., 2018; Hajimehdipoor ve ark., 2010; Louchard ve ark., 2017; Ramos ve ark., 2014 ve Rushworth ve ark., 2014)

asetonitril gibi organik çözücü ve su karışımından oluşan mobil fazların ve çözücülerin kullanıldığı, C18 ve 250 x 4,6 mm 5 mikron çap özelliğindeki kolonlardan geçirilen mobil faz içerisindeki etkin maddenin UV veya DAD dedektörde 225-278 nm aralığındaki dalga boylarında oluşturduğu absorbans ölçümleriyle yapıldığı görülmektedir.

Analitik metot; çalışmada üretilecek formülasyonların kalite özelliklerinin belirlenmesi ve stabilitesinin takip edilmesi, *in vitro* salım çalışmalarında kovan içi havadaki timol konsantrasyonlarının ölçümleri, bal, bal mumu gibi matrislerde timol kalıntı düzeyinin araştırılmasına kadar birçok aşama için önemli bir bileşen olarak ortaya çıkmaktadır. Bu doğrultuda çalışma ile ilgili verilecek kararlarda, analitik metot ile yapılan ölçümlerin doğru ve kesin olmasının sürekli olarak sağlanabilmesi adına, uluslararası otoritelerce veteriner tıbbi ürünlerdeki etkin maddelerin yüksek basınçlı sıvı kromatografi ile kantitatif tayini için belirlenen gerekliliklere uygun olarak metodun geçerli kılınması gerekmektedir.

#### **1.5. Kontrollü Salım Sistemleri ve Timolün Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanımı**

Bir ilacın temelde sahip olması gereken özellikleri; seçicilik, etkili doz ve mümkün olan en az yan etkidir. Farmokolojide, sağaltım aralığı (penceresi) belirlenmesi çok önemlidir. Bu aralığın üst sınırı toksisiteye yol açarken, alt sınırı etkisiz sonuca sebep vermektedir. Bu durum özellikle, farklı canlı türlerinde benzer mekanizmalar vasıtasıyla etki oluşturan ilaçların, bu canlılara aynı anda uygulanması durumunda hedef türün güvenliği bakımından dozun kontrol edilmesi daha fazla önem kazanmaktadır. Örneğin, varroosis enfestasyonu gibi zararlı *Varroa* akarı ve yararlı tür olan bal arısının birlikte bulundukları durumda, her iki tür içinde aynı mekanizma ile etki oluşturan timolün uygulaması hem *Varroa* akarı hem de bal arısında maruziyet oluşturmaktadır. Uygulamada hedeflenen, kolonideki akar seviyesi ekonomik zarar seviyesi altına indirilirken, arı sağlığı ve

koloni sürdürülebilirliğini güvende tutmaktır. Timolün maruziyet yoluna bağlı olarak değişmekle birlikte topikal  $ÖD_{50}$  değerleri akar için 56,1 µg, yetişkin bir işçi arı için 210,3 µg, bir arı larvası için 150,7 µg olarak bildirilmektedir (Gashoutl ve Guzman-Novoa, 2009). Ayrıca timolün 5-15 µg/L arası kovan içi hava konsantrasyonunda solunum yoluyla maruziyetinin *Varroa* akarı üzerinde çok etkili olduğu ancak 20 µg/L hava konsantrasyonunda %90 arı ölümü şekillendirdiği bildirilmektedir (Imdorf ve ark., 1995).

Varroosis mücadelesi amacıyla timol etkin maddesi saf halde ya da farklı yardımcı maddelerden oluşturulan formülasyonlar halinde genellikle kovan çerçeveleri üst kısmına konulmaktadır (Imdorf ve ark, 1999). Uygulanan timol, kolonide işçi arıların genellikle besin depolanması ve kuluçka gözlerinde yavru yetiştirilmesi sırasındaki hareketleri, koloniyi temiz tutmak için istenmeyen materyalleri kovan dışına taşınması davranışı ile uygulama alanından uzaklaştırmakta veya daha seyrek olarak da propolisle kaplama davranışı yoluyla bulundukları yerde izole edilmektedir (Bogdanov ve ark., 1998 ve Floris ve ark., 2004).

Bahsedilen sorunlar timolün saf halde ya da arılar tarafından uzaklaştırılmasına uygun formülasyonlar şeklinde uygulandığında gerçekleşmekte, maruziyet yolunu ve uygulanacak dozu kontrol etmek kapsamında literatürde sürekli salım sağlayan enerji bağımlı bir sistemin kullanıldığı (Qodratollah ve ark., 2017), yüksek akarisidal etkinlik yanında koloni sağlığının korunmasında başarı elde edildiği bildirilmektedir.

Etkin maddenin daha uzun süre boyunca, uygun doz ve hızda etkinin gerçekleşeceği ortama verilmesi için enerjiden bağımsız salım sistemleri olarak KSS geliştirilmekte, bir taşıyıcı destek malzemesine yüklenen etkin maddenin buradan ortama istenen hızda, ihtiyaç duyulan dozda ve gerekli süre boyunca serbestleşmesi temin edilmektedir. Böylece sağaltım ortamında ilaç derişimi sabit bir şekilde ve sağaltım penceresinde kalmaktadır. KSS biyomedikal, farmasötik,

teknoloji ve tarım alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Özgündüz, 2006).

Hidrojeller KSS için vazgeçilmez malzemelerdir. Hidrojeller, suda çözünmeyip kendi kuru kütlelerinin en az %20'den fazlası miktarlarda su absorplayabilen, çapraz bağlı, üç boyutlu, hidrofilik polimerik yapılardır. Polimerler arasındaki çapraz bağlar kimyasal (kovalent veya iyonik) veya fiziksel (kristalinite) olarak şekillenebilmekte ve bu bağlar sayesinde suda çözünmemektedirler. Hidrojellerin üç boyutlu yapısı kimyasal bağlar ya da iyonik etkileşim, hidrojen bağı, fiziksel etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler gibi kohezyon kuvvetleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Hidrojeller, biyoyumlulukları nedeniyle kontak lens, biyosensörler için membran, yapay kalp, kas ve deri materyalleri, kontrollü ilaç salım sistemleri ve enzim immobilizasyonları için destek materyal olarak kullanılmaktadır. Kimyasal çapraz bağlanma ile hidrojel hazırlanması, doğrusal veya dallanmış homopolimer ya da kopolimerin az miktarda çapraz bağlayıcı kullanılarak doğrudan çapraz bağlanması ile gerçekleştirilir. Bu tepkime genellikle sulu çözelti içinde süspansiyon polimerizasyonu ile yürütülmektedir. En çok kullanılan çapraz bağlayıcılar gluteraldehit, formaldehit ve asetaldehit gibi aldehitlerdir (Özgündüz, 2006).

Timol gibi biyopestisitler bakımından, ideal bir KSS'nin sahip olması gereken temel özellikler şunlardır: (1) uygulama alanında aktif maddenin yavaş ve sürekli olarak salımına izin vermeli, (2) düşük salım hızının etkinlik ve yüksek salım hızının toksisite oluşturma bakımından önemli olduğu göz önünde bulundurulduğunda sağaltıcı doz aralığında kalacak şekilde salım gerçekleşmeli, (3) bir ilk hızlı salım ile dozun sağaltım penceresine girişi ve ardından uzun ve sabit bir salım hızı ile bu konsantrasyonun ihtiyaç duyulan süre boyunca herhangi bir ek uygulama gerekmeden sürdürülmesidir (Maes ve ark., 2019).

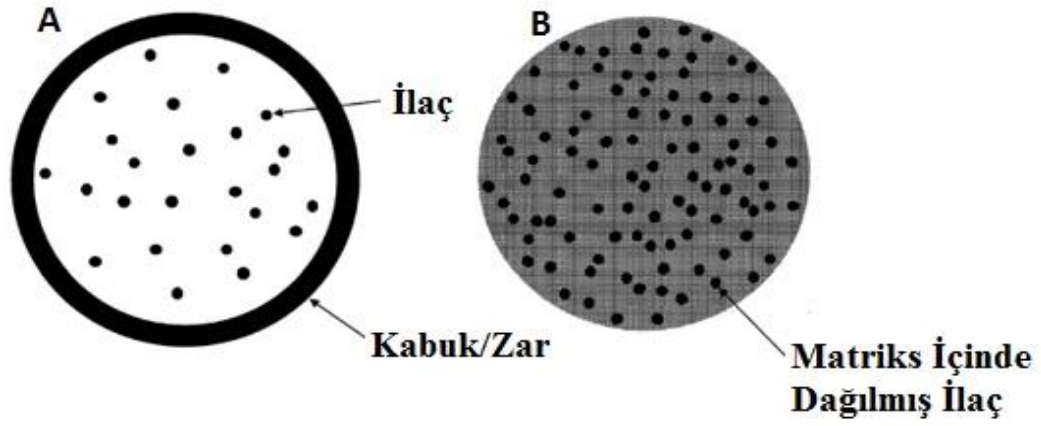
KSS etkin maddenin saf haline ya da hemen salıma uygun formülasyonlarına göre yapısal olarak farklılıklar gösterirler. KSS'nde bulunan etkin madde, ya bir film (zar olarak da belirtilir) ile kaplanan bir ilaç rezervuarında ya da ilacın dağıldığı

bir matriks içinde yer alır. Buradan değişik salım kinetikleri ile daha yavaş ve kararlı salım süreçleri gerçekleşir (Chen ve ark., 2018).

KSS, gereken ilaç miktarının en aza indirilmesini, makul yan etkilerin azaltılmasını ve uygulama sıklığının düşürülmesini (Maes ve ark., 2019), etkin maddenin sıcaklığa, oksidasyona, neme, mikroorganizmalara karşı stabilitesini sürdürmesini ve yüksek uçuculuğunun önlenmesi gibi avantajlar sunmakta (Bhalereo ve Wang, 2018), ayrıca kullanılan polimerik taşıyıcıların olası toksisitesi veya biyouyumlu olmaması, *in vitro* salım ile *in vivo* salım arasında öngörülemeyen ve zayıf korelasyon, istenmeyen bozunma ürünleri, dozaj ayarlama zorluğu, zayıf sistemik kullanılabilirlik ve maliyet gibi çeşitli dezavantajları barındırabilmektedir. Bu sebeplerle amaçlanan salım davranışı ve salım ortamına göre KSS'nin farklı yönlerin ele alınması gerekmektedir (Huynh ve Lee, 2014).

Yüklenen etkin maddenin salımı; salım ortamı, difüzyon, ilaçların moleküler ağırlığı ve çözünürlüğü, gözenek boyutu ve polimerik taşıyıcıların bozunması gibi birçok farklı faktör tarafından değiştirilebilmektedir (Huynh ve Lee, 2014).

KSS için başlıca salım mekanizmaları difüzyon, çözünme, ozmotik pompalama ve şişmedir (Chen ve ark., 2018). Bahsedilen salım mekanizmalardan, timol gibi süblimleşebilen ilaç moleküllerinin, daha yüksek konsantrasyonlu olduğu sistem yapısından kovan içi havaya geçişi difüzyon mekanizması ile gerçekleşmektedir. Difüzyon KSS'nde, sistemin üretim şekline ve elde edilen sistemin yapısına bağlı olarak, rezervuar kontrollü ve matriks kontrollü salım mekanizmaları oluşturulmaktadır (Chen, 2018 ve Reddy ve ark., 2017). Rezervuar KSS'nde, etkin madde bir kaplama materyali tarafından kapsüllenirken, matriks KSS'nde etkin madde bir matriks içerisinde dağılır (Chen ve ark., 2018).



**Şekil 1.2.** Rezervuar KSS Yapısı (A) ve Matriks KSS (B) Yapısı (Chen ve ark., 2018).

İlacın bu sistemlerden salım hızı genel olarak sıfır derece ve birinci derece kinetiğine göre gerçekleşmektedir. Sıfır derece kinetiğinde, sağaltım penceresinde sabit bir ilaç salım hızı oluşurken, birinci derece kinetiğinde azalan oranda ilaç salım hızı gözlenir (Chen ve ark., 2018).

Literatürde timol etkin maddesinin kontrollü salımına dair yapılan çalışmalar incelendiğinde; oluşturulan kapsül boyutuna göre kapsülasyon-enkapsülasyon ( $> 1$  mm), mikrokapsülasyon-mikroenkapsülasyon ( $1-1000 \mu\text{m}$ ), nanokapsülasyon-nanoenkapsülasyon ( $< 1000 \text{ nm}$ ) olarak adlandırılan teknikler ile hem doğal hem de sentetik polimerler kullanılarak kapsül içeriğine timol etkin maddesinin hapsedildiği KSS oluşturulabilmektedir (Bhalereo ve Wang, 2018; Kaur ve ark., 2018 ve Maes ve ark., 2019).

Çekirdek materyali olan timol etkin maddesi ile farklı morfolojide KSS oluşturmak, kabuk materyali olan polimerleri çekirdek materyaline adapte ederek çeşitli boyutlara, kabuk kalınlığına ve geçirgenliğe sahip partiküller oluşturmak, böylece aktif maddenin salım oranını ayarlamak adına kimyasal yöntemler (Süspansiyon, Emülsiyon, Dispersiyon/çökelme polimerizasyonu, Polikondenzasyon), fizikokimyasal yöntemler (Koaservasyon, Katman katman (L-B-L) montajı, Akışkan yataklı kaplama, Santrifüj teknikleri, Sol-jel kapsülleme,

Süperkritik CO<sub>2</sub> destekli mikroenkapsülasyon, Vakum kapsülleme, Elektrostatik kapsülleme) ve fizikomekanik yöntemler (Püskürtmeyle kurutma, Çoklu nozzle püskürtme) kullanıldığı bildirilmektedir (Bhalereo ve Wang, 2018).

Timolün kapsüllenmesinde biyobozunur polimerler olan ksantan sakızı, poli vinil alkol (PVA), jelatin, nişasta, sodyum aljinat ve etil selüloz yaygın olarak kullanılmaktadır (Bhalereo ve Wang, 2018 ve Kim, 2004).

Ayrıca timol ile benzer yapı gösteren esansiyel yağ kaynaklı monoterpenlerin kapsüllenmesinde, maltodekstrin, siklodekstrinler, polilaktik asit (PLA), kitosan, Arabistan zamkı polimerlerinde de yararlanılmaktadır (Marques, 2010; Martins ve ark., 2011; Martins ve ark., 2014 ve Souza ve ark., 2014).

KSS tasarlanırken hedeflenen etkinlik bakımından salımın gerçekleştirileceği ortam, salımın tipi-hızı-süresi, hedef tür dışı canlılar bakımından sistemin biyoyumluluğu, seçilecek hazırlama yönteminin, kabuk materyali olan polimerler ve yöntemde kullanılan diğer kimyasallar değerlendirilmesi gereken temel konular olup, kullanılan teknik ve polimerlere bağlı olarak farklı düzeyde verimlerle timol kapsüllemesi ve salımı gerçekleştirilebildiği bildirilmektedir (Bhalereo ve Wang, 2018).

İstenilen amaca uygun bir KSS geliştirilmesinde, etkin madde salımının istenilen dozda yine istenilen süre boyunca devam edebilmesi için sisteme yeterli düzeyde etkin madde yüklenmesi ve sistemin istenmeyen dış etkilere karşı uygulama alanında yeterli süre kalabilmesi için denemeler yapılmakta olup, ayrıca karakterizasyon, morfolojik yapı, farmasötik kalite ve stabilite özellikleri ile *in vitro* salım özellikleri incelenmektedir (Moretti ve ark. 2002; Souza ve ark., 2014 ve Zhu ve ark., 2019).

Literatürde timolün başarı ile KSS'ne uygulanabildiği (Ayala-Zavala ve ark., 2010; Kaur ve ark., 2018; Martins ve ark., 2012 ve Zamani ve ark., 2015) ayrıca çoğunlukla sıvı ortama salım gerçekleştirildiği bildirilmektedir.

Literatürde, gıdaların raf ömrünün uzatılması amaçlı timolün hava ortamına salımı için ambalaj materyali geliştirme çalışmalarında KSS'nden yararlanıldığı bildirilmektedir (Liu, 2016).

#### 1.6. Timol Salım Düzeyinin Ölçülmesi İçin *in vitro* Salım Sistemi

*In vitro* testler, ilaçların popülasyonlarda kullanmaya geçmeden önce özelliklerini araştırmak ve geliştirmek amacıyla yoğun olarak kullanılan yöntemlerdir. *In vitro* testler daha düşük maliyetlerle ve daha kısa sürelerde, non invaziv ve basit tekniklerle gerçekleştirilebilmeleri yanında, *in vivo* testler için ön görüsel değer taşıma ve hatta belirli koşullarda onların yerini tutabilme özelliklerine sahiptir (Kayaalp, 2007).

Akarisidal amaçla timolün kolonilere uygulaması sonrası farmakolojik ve toksikolojik etkileri üzerine, kolonilerdeki biyolojik ve biyolojik olmayan kompartımanların varlığı, nitelik ve niceliği ile biyolojik kompartımanlardaki beslenme, üreme gibi dinamik süreçler ve çevresel koşullar etkili olabilmektedir (Bogdanov ve ark., 1998; Floris ve ark, 2004; Gashoutl ve Guzman-Novoa, 2009; Martel ve Zeggane 2002 ve Sanchez ve ark., 2021).

Bal arısı kolonilerinin yaşam alanı olan kovanlar doğada farklı çevresel koşullara maruz kalmaktadır. Bu aşırı yüksek ya da düşük sıcaklık, kuraklık gibi zorlu çevresel koşullara karşı, kovanda besin depolanması ve kuluçka gözlerinde yavru yetiştirilmesi ile koloni devamlılığı için hayati önemli görevlerin sürdürülebilmesi adına sıcaklık, nem, oksijen ve karbondioksit düzeylerinin hassas dengesinin korunması gerekmektedir. Bal arısı kolonilerinde işçi arılar tarafından

temelde kovan içindeki havanın değişiminin sağlanması yoluyla yapılan faaliyetlerle bu dengenin bir dereceye kadar korunması sağlanabilmektedir (Çetin, 2004; Fragkou ve Stevenson, 2012; Meikle ve ark., 2017; Southwick ve Moritz, 1987, ve Sudarsan ve ark., 2016).

Arıların normal faaliyetlerini sürdürebilmeleri için uygun kovan içi sıcaklık, 21 °C ile 35 °C arasında değişmektedir. Kuluçka gözlerinde yavru büyütme 33-34 °C de gerçekleşmektedir. 10 °C altındaki ve 36 °C üzerindeki sıcaklıklar arıların üreme ve besin toplama gibi faaliyetlerini durdurmaktadır. Arılar 10 °C civarında uçuş yeteneklerini kaybetmeye başlamakta, 7 °C ise tamamıyla hareketsizleşmektedirler (Çetin, 2004). Meikle ve ark. (2017), farklı koloniler ile farklı bölgelerde Sonbahar, Kış ve İlkbahar Aylarında çevre ve kovan sıcaklıklarını takip ettikleri çalışmalarında çevre sıcaklığına bağlı olarak kovan içi sıcaklıkların 10-35 °C aralığında değiştiğini bildirmektedirler. Farklı arı ırkları ile yaptıkları çalışmada Toledo ve Nogueira-Couto (1999), benzer sonuçlar bildirmektedirler.

Kolonilerde bağıl nemin, arılar tarafından hava akımı oluşturularak %40 ila %60 aralığında tutulmaya çalışıldığı bildirilmektedir (Fragkou ve Stevenson, 2012 ve Meikle ve ark., 2017).

Timolün saf toz haliyle veya vermikülit içerisinde kolonilere uygulandığında akarisidal etkinliğinin çevre sıcaklığı ile pozitif yönde ve nem ile negatif yönde korelasyon gösterdiği bildirilmektedir (Emsen ve ark., 2011). Bir başka çalışmada (Zhu ve ark., 2019) 25 °C sıcaklıkta %50 nem ve %90 nem düzeylerinde timol süblimleşmesi oranları arasında yaklaşık %50 oranında farklılık bulunduğu bildirilmektedir.

Arıların, kolonilerinin devamlılığında çok önemli olan kovandaki sıcaklık, nem ve karbondioksit düzeylerini kontrol etmek için yine kovanlarını havalandırdıkları bilinmektedir. Arılar antenlerinde bulunan karbondioksit reseptörleri ile havadaki değişimleri algılayabilirler ve kovan içi karbondioksit

düzeyi %1' e ulaştığında kovan giriş deliğinde kanat hareketleriyle hava değişimi yaparak normal seviyelere (normal atmosferik karbondioksit seviyesindeki %0,04) indirmek için tepki verirler (Sudarsan ve ark., 2016). Bal arılarının, kovan içi hava dengesini sağlamak için kanatlarını çırpma vasıtasıyla omurgalılarıdaki nefes verme ve nefes alma davranışlarına benzer düzenli bir havalandırma sistemi oluşturduğu görülmektedir. Nefes alma etkinliği 22-30 saniye arasındaki kısa döngüler halinde gerçekleşmekte ve kovanda gün içindeki normal ventilasyon ortalama  $0,42 \pm 0,01$  L/dk olarak gerçekleşmektedir (Southwick ve Moritz, 1987).

Timolün farmakolojik olarak kolonilerdeki biyolojik ve biyolojik olmayan kompartımanlardaki varlığı, kalıcılığı ve dağılım durumu bakımından bakıldığında; akarisidal amaçlı 30 g timol içeren bir formülasyon uygulanan bir çalışmada, sağaltım sırasındaki timol varlığı biyolojik kompartımanlarda sırasıyla 368 ng/larva, 349 ng/prepupa, 634 ng/pupa, 1767 ng/erişkin arı düzeylerinde, biyolojik olmayan kompartımanlarda sırasıyla 1034 µg/kg bal, 1576 µg/kg bal mumu, 1021 µg/kg polen düzeylerinde tespit edildiği, sağaltımdan üç ay sonrası yapılan kontrollerde biyolojik kompartımanlardaki timol varlığının erişkin arılarda %69, larva, prepupa ve pupada %90 üzerinde azaldığı, bal mumu ve balda ise sırasıyla %17 ve %15 düzeyinde azaldığı ve kalıcılığının yüksek düzeyde olduğu bildirilmektedir (Sanchez ve ark., 2021).

Timol gibi süblimleşen kimyasalların yeterli akarisidal etkinlik ve hedef hayvan türü bakımından güvenilirlik sağlayabilmeleri için kovan içi hava ortamında belirli bir konsantrasyonda yeterli sürede kalmaları gerekli olup kimyasal maddenin fizikokimyasal özellikleri yanında kovan içi dinamik süreçlerin de dahil edilmesi gerekmektedir. Bu sebeple Imdorf ve ark. (2006), *in vitro* şartlarda kimyasal maddeler ve formülasyonlar bakımından doz belirleme için oluşturdukları deney tasarımı, kimyasalların atılımında etkili olan kovan içi dinamik süreçlerden, arıların ventilasyon davranışı ile kolonilerini havalandırma durumunu yansıtmak için bir hava akımı düzeneği kullandıkları görülmektedir.

### 1.7. *In vivo* Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Belirleme Çalışmaları

Sürdürülebilir akar kontrolü için başarının yolu, akar ve arı popülasyon dinamiklerinin yakından takip edilerek uygun bir zamanda akarisidal mücadeleye başlanmasından geçmektedir. Yaz mevsimi sonları ve sonbahar mevsimi başındaki dönemler, kolonilere bal ve polen akışının azaldığı, kısa ömürlü yaz arılarının yerine uzun ömürlü kış arılarının yetiştirildiği ve koloniler arası soygun davranışlarındaki artış sonucu akar enfestasyonu bir koloniden diğerine kolaylıkla yayılabildiği dönemlerdir. Belirtilen nedenlerle uygun zamanlama ile yapılacak akar mücadelesi bir sonraki yetiştirme dönemine kadar koloninin hayatta kalması için çok önemlidir (Blacqui re ve ark., 2017).

Timol etkin maddesi içeren ticari akarisidal ilaçların uygulama dokümanları incelendiğinde; yüksek akarisidal etkinlik elde edebilmek adına  evre sıcaklığının 15  C üzeri olduğu geç yaz döneminde uygulama yapılması önerilmekte diğer yandan gerekli durumlarda 15  C üzeri olduğu İlkbahar döneminde de uygulama yapılabileceği bildirilmektedir. Daha düşük  evre sıcaklı larında kolonilerde kış salkımı oluşması nedeniyle yapılacak uygulamanın ana arı ölümüne sebep olabileceği (Anon, 2018a),  evre sıcaklığı 30  C'yi (Anon, 2014a ve Anon, 2020a) açtığı durumlarda ise arılarda ajitasyon, kaçışma (Anon, 2018a), kuluçka ve yetişkin arılarda ölüm oranı artışına (Anon, 2014a) sebep olabileceği için bu zamanlarda uygulama yapılmaması gerektiği belirtilmektedir.

Varroosis mücadelesinde kullanılan kimyasallar için *in vivo* koşullarda bal arısı kolonilerinde gerçekleştirilecek çalışmalar için uluslararası ilaç otoritelerinden biri olan Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından, arılarda *Varroa destructor* enfestasyonu kontrolü amacıyla kullanılan veteriner tıbbi ürünler için etkinlik ve hedef hayvan güvenliğinin araştırmaları hakkındaki bir rehberde yapılacak araştırmaların Doz Titrasyon-Doz Doğrulama ve Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi  alı maları şeklinde iki aşamada ger ekle tirilebilece i belirtilmektedir (Anon, 2021a).

Bunun yanında *in vivo* akarisisidal etkinlik-hedef tür tolerans düzeyi çalışmalarının sürdürülebilirliği ve elde edilen verilerin güvenilirliğinin artırılması bakımından çalışmalara başlamadan önce kullanılacak kolonilerin pestisit maruziyetleri ve noseosis enfestasyonu bakımından mevcut sağlık durumlarının kontrol edilerek uygun kolonilerin seçiminin sağlanmasını öneren bilimsel tavsiyeler bulunmaktadır (Meikle ve ark., 2017).

Arı kolonilerinde noseosis, *Nosema* spp. türü parazitler tarafından ergin bal arılarında oluşturulan, bulaşıcı bir sindirim sistemi hastalığıdır (Anon, 2014b). Arı başına yüksek düzeyde *Nosema* spp. spor miktarlarının tespitinin, kolonideki arı ölümleriyle net bir bağlantısı olmamakla birlikte, 1 milyon adet üzeri spor saptanan kolonilerin sağlık bakımından endişe verici durumda oldukları bildirilmektedir (Mortensen ve ark., 2019).

#### **1.8. Bal ve Bal Mumunda Timol Kalıntısı Oluşumu ve Kalıntı Düzeyleri**

Arı hastalıklarının kontrolü ve sağaltımında kolonilere uygulanacak kimyasal maddelerin erişkin ve kuluçkadaki için önerilen dozlarda zararlı olmaması, bal ile bal mumu gibi ürünlerde kalite ve tüketici sağlığı bakımından zararlı olabilecek düzeylerde kalıntı bırakmaması gereklidir (Imdorf ve ark., 1999).

Timol maruziyetinin bal arıları üzerindeki etkileri bakımından; 24 saat maruziyet sonrası ana arı için 3240 µg/g (583,2 µg/ana arı) ve işçi arılar için 524 µg/g (56,6 µg/işçi arı) ÖD<sub>50</sub> değerleri tespit edildi (Dahlgren ve ark., 2012). Başka bir çalışmada (Gashoutl ve Guzman-Novoa, 2009) timol 0,75 mg/flakon dozunda *V. destructor* için %100 düzeyinde mortalitesi oluşturmuş olup, ÖD<sub>50</sub> değerleri akar için 56,1 µg, yetişkin bir işçi arı için 210,3 µg, arı larvası için 150,7 µg olarak tespit edildi. Timolün varroosis mücadelesinde 5-15 µg/L arası kovan içi hava konsantrasyonda akarlar üzerinde çok etkili olduğu, 20 µg/L konsantrasyonunda %90 oranında arı ölümü şekillendirdiği bildirilmektedir (Imdorf ve ark., 1995).

Timolün kolonilerde kullanımı sonrası arı ürünlerinde oluşturacağı muhtemel kalıntısı ve tüketici sağlığı bakımından değerlendirildiğinde, Avrupa Birliği tarafından timolün grup II toksik olmayan bir veteriner ilacı olarak kabul edildiği ve MKL gerektirmediği görülmektedir (Anon, 2001; Anon, 2018c; Bogdanov, 1998; Mutinelli, 2003 ve Mutinelli, 2016). Timolün insanlar için günlük alım limiti (ADI) 0,03 mg/kg vücut ağırlığıdır (Anon, 2018c). Avrupa Birliği'nde gıdalarda 50 mg/kg düzeydeki timol kalıntısı kabul edilebilir olmakla birlikte 2 mg/kg'dan daha yüksek düzeydeki kalıntının balın tadını değiştirebileceği bildirilmektedir (Trouiller, 2004). Timolün balda oluşturduğu tat değişikliği için sadece İsviçre'de 0,8 mg/kg olarak bir kalıntı limiti bulunmaktadır (Anon, 2001).

Kolonilere timol uygulaması yapıldıktan sonra bal ve bal mumu gibi arıcılık ürünlerinde oluşan timol kalıntı düzeylerinin araştırıldığı çalışmalarda: ApilifeVar® adlı akarisidal ilacın kolonilerde varroosis mücadelesi için ardışık dört yıl boyunca yapılan sonbahar mevsimi uygulamaları ve takip eden ilkbaharda bal ve bal mumunda oluşturduğu timol kalıntıları incelendiğinde, balda ortalama 0,15 mg/kg, bal mumunda ortalama 21,6 mg/kg düzeyinde kalıntı tespit edildi (Bogdanov ve ark., 1998).

Floris ve ark. (2004), tarafından ApilifeVar® ve Apiguard® adlı timol içeren akarisidal ilaçların kolonilerde varroosis mücadelesi için kullanımı ve sonrası bal ile bal mumunda oluşturduğu timol kalıntılarını inceledikleri çalışmalarında, balda timol kalıntısının ApilifeVar® için 0,12 ila 4,03 mg/kg ve Apiguard® için 0,40 ila 8,80 mg/kg arasında değiştiği, bal mumunda ApilifeVar® için 21,6 mg/kg ve Apiguard® için 147,7 mg/kg timol kalıntısı şekillendiği tespit edildi. Her iki formülasyonun kolonilere uygulanmasının ardından iki haftalık süreç içerisinde arılar tarafından yaklaşık %95'inin uygulama alanından uzaklaştırıldığı bildirildi. Timolün lipofilik yapısı nedeni ile baldan ziyade bal mumunda birikmeye daha yatkın olduğu ancak bekletme ile bal mumundaki timol miktarının azaldığı tespit edildi (Bogdanov ve ark., 1998 ve Floris ve ark., 2004).

Bal ve bal mumunda oluşan timol kalıntı düzeylerinin ölçümü için kullanılan numune hazırlama ve analitik ölçüm metotları incelendiğinde; kolonilerden alınan bal ve bal mumu numunelerine bir takım özütleme işlemleri uygulandığı ardından gaz kromatografi (Bogdanov ve ark., 1998 ve Floris ve ark., 2004) ya da sıvı kromatografi (Martel ve Zeggane, 2002) tekniklerine dayalı analitik metotlarla ölçümlerin yapıldığı görülmektedir.

Gaz kromatografi ile sıvı kromatografi analitik metotlarının sunmuş oldukları özellikler yapılacak çalışma amacına uygunluğu bakımından değerlendirildiğinde, sıvı kromatografik metotların pratiklik, kısa analiz süresi ve timol tat kalıntısı limitlerinde tayin yapılabilmesi için yeterli düzeyde hassasiyet sunması avantajlarının (Martel ve Zeggane, 2002) olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, timolün biyouyumlu olduğu bildirilen polimerler ve hidrojel tekniğı ile oluşturulan KSS'nin varroosis mücadelesinde kovan içi hava ortamına timol salımı yoluyla kullanımı, sistemin oluşturduğu akarisidal etkinlik, hedef tür arılarda tolerans düzeyleri ve bal ile bal mumunda timol kalıntı düzeyleri bakımından timol içrikli referans ilaçla karşılaştırılması, timolün varroosis mücadelesinde KSS ve mevcut timol içrikli ilaçlar ile yapılan uygulamaları arasında olası fark ve düzeyinin araştırılması amaçlandı.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Timol Tayini İçin Analitik Metot Geliştirme ve Metodun Geçerli Kılınması

Kontrollü salım sistemlerinin, kalite özelliklerinin belirlenmesi ve optimize edilmesi, *in vitro* salım çalışmalarında doz ölçümleri, raf ömrü stabilitesinin takip edilmesi, bal, bal mumu gibi matrislerde timol kalıntısının tayini için yapılan ölçümlerin doğru ve kesin ve tekrarlanabilir olabilmesi adına kullanılacak analitik metodun geçerli kılınması gerekmektedir. Veteriner tıbbi ürünler ile ilgili sıvı kromatografi temelli analitik metotların geçerli kılınması için gereken şartların belirtildiği Veteriner Tıbbi Ürünler İçin Teknik Gerekliliklerin Uluslararası Uyumlaştırma Konseyi (VICH) tarafından yayımlanan kılavuz (Anon, 1998) ve analitik metotlarda kullanılan çözeltilerin stabilitesi ile ilgili yapılacak çalışmalar hakkında bilgi veren Uluslararası Beşeri Kullanıma Yönelik Farmasötiklerin Teknik Gerekliliklerini Uyumlaştırma Konseyi (ICH) tarafından yayımlanan kılavuzlar (Anon, 1995 ve Anon, 1996) temel alınarak ilgili analitik metodun geçerli kılınması planlandı.

#### 2.1.1. Timol tayini için analitik metot geliştirme çalışması

Tüm kromatografik analizler yüksek basınçlı sıvı kromatografi cihazı ve diyot sıralı dedektör (HPLC-DAD) (Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000) sistemi ile Chromeleon 7.2.9 (Thermo Scientific) yazılımı aracılığı ile gerçekleştirildi. Analitik ayırım ters faz C18 (ACE 5 C18, 250x4,60 5 µ) kolon ve C18 koruyucu ön kolon (Phenomenex Security Guard 4x20 mm) ile sağlandı. Numune ve standart çözündürme, seyreltme aşamalarında vorteks (Heidolph multireax), ultrasonik banyo (Isolab), santrifüj (Hettich), sıcak su banyosu (Memmert), Katı faz özütleme manifoldu ve vakum pompası (Thermo Scientific)

kullanıldı. Numune hazırlığında ayrıca şırınga ucu filtre PTFE 0,45 µm (Isolab), katı faz özütleme kartuşu (SPE) (SiliaPrep™, SPE-R00230B-03P) kullanıldı.

Referans standart ve kimyasal madde; timol referans standardı (%99,6 saflık, Dr. Ehrenstorfer), p-cumenol referans standardı (%99,6 saflık, Dr. Ehrenstorfer), timol teknik kalite standart (%99 saflık, Sigma-Aldrich), asetonytril (HPLC grade, Sigma-Aldrich), metanol (HPLC grade, Merck), N metil 2 pirrolidon (Teknik kalite, BASF), ayçiçek yağı (Gıda kalitesi, Yudum) ve distile su kullanıldı.

Çözücülerin Hazırlanması: HPLC kalitesinde saf asetonytril ve bundan distile su ile hazırlanan %80 saflıktaki asetonytril çözeltisi kullanıldı.

Standartların hazırlanması:

Stok p-cumenol internal standart çözeltisi hazırlanması: 10 µg/mL

100 mL'lik balon jojeye yaklaşık olarak 10 mg tartılan p-cumenol standardı asetonytril ile 100 mL hacme tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alınarak 10 mL balon jodede %80 asetonytril ile 10 mL hacme tamamlandı. 1000 rpm hıza ayarlı mekanik karıştırıcıda 20 dk süre ile çözünmesi sağlandı.

Stok timol standart çözeltisi-1 hazırlanması: 10 µg/mL

100 mL'lik balon jojeye yaklaşık olarak 10 mg tartılan timol standardı asetonytril ile 100 mL hacme tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alınarak 10 mL balon jodede %80 asetonytril ile 10 mL hacme tamamlandı. 1000 rpm hıza ayarlı mekanik karıştırıcıda 20 dk süre ile çözünmesi sağlandı. Bu şekilde elde edilen stok timol çalışma standardından (1 mg/mL) kalibrasyon eğrisi oluşturmak için, kör; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15 µg/mL oranlarına santrifüj tüplerinde %80 asetonytril çözeltisi kullanılarak seyreltildi.

Stok timol standart çözeltisi-2 (500.000) µg/mL hazırlanması: 10 mL'lik balon jojeye yaklaşık olarak 5 g timol standardı tartıldı ve ayçiçek yağı ile 10 mL

hacme tamamlandı. Ultrasonik banyoda 20 dk süre ile çözünmesi sağlandı. Tüm standartlar, 0,45 µm PTFE (İsolab) şırınga ucu filtre ile süzülerek cam viallere alındı ve HPLC-DAD ile analiz edildi.

#### Numunelerin hazırlanması:

Referans ilaç numunesi hazırlama; mekanik karıştırıcı ile homojenize edilen Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından pazarlama izinli bal arılarının varroosis mücadelesinde kullanılan ve içeriğinde 12,5 g timol içeren ilaç numunesinden yaklaşık 10 mg timol etkin maddesini içerecek şekilde (yaklaşık 40 mg) hassas terazi ile tartılarak 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı, balon joje 10 mL hacme kadar %80 asetonitril çözücüsü ile tamamlandı. Ardından stok referans ilaç çalışma çözeltisinden 0,1 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve 10 mL hacme kadar %80 asetonitril çözücüsü ile tamamlandı.

Hidrojel numunesi hazırlama; bir bistüri yardımıyla mekanik olarak küçük parçalara ayrılan hidrojelden yaklaşık 10 mg timol etkin maddesini içerecek şekilde (yaklaşık 40 mg) hassas terazi ile tartılarak 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve 10 mL hacme %80 asetonitril çözücüsü ile tamamlandı. Ardından 70 °C sıcaklıktaki su banyosunda 1 saat bekletildi. Oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra hidrojel stok çalışma çözeltisinden 0,1 mL alınarak 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve balon joje 10 mL hacme kadar %80 asetonitril çözücüsü ile tamamlandı.

Havadan özütlenen timol numunelerinin hazırlanması: çalışma kapsamında *in vitro* salım denemeleri için oluşturulan sistemde iklimatik kabin içerisinde bulunan, polipropilenden imal edilmiş bir kovan içinden vakum pompası vasıtasıyla 0,42 L/dk ( $\pm 0,01$ ) hava akış debisiyle vakumlanarak, içerisinde 500 mL hacimde %10 n metil 2 piroolidon çözeltisi ve 2 µg/mL düzeyinde internal standart olarak p-cumenol etkin maddesi bulunan ardışık 3 adet gaz yıkama şişesinden geçirilen kovan içi havada bulunan buhar haldeki timolün gaz yıkama şişelerindeki çözeltide tutulması ve timolden arındırılan havanın tekrar kovana

geri verilmesi şeklinde kapalı sistem bir hava döngüsü sağlandı. Çözücü tuzaklarında tutulan timol etkin maddesinin oluşturduğu konsantrasyonların tayini için gaz yıkama şişesinden HPLC-DAD sistemi enjeksiyon hattına peristaltik pompa aracılığı ile kapalı sistem bir çözücü döngüsü sağlandı. HPLC-DAD sisteminde oluşturulan enjeksiyon listesi ile verilen komutlar sonucu sürekli çözücü akışı gerçekleşen enjeksiyon hattından 144 dk aralıklarla 20 µl miktarda numune HPLC-DAD sistemine enjekte edildi ve gaz yıkama şişelerinde oluşan timol etkin maddesi konsantrasyonlarının kümülatif tayini sağlandı.

Bal numuneleri hazırlama; 2,5 g bal 50 mL'lik polipropilen santrifüj tüplerine tartıldı ve üzerine 7 şer mL distile su eklendi. Üzerine 10 µg/mL p-cumenol konsantrasyonlu internal standart çözeltisinden 1 mL eklendi. 1000 rpm hıza ayarlı mekanik karıştırıcıda 20 dk süre ile homojen çözelti haline gelmesi sağlandı. 6 mL metanol ve 6 mL su ile aktive edilen katı faz özütleme kartuşundan (SiliaPrep™, SPE-R00230B-03P) numuneler geçirildi. SPE kartuşlar ardında 6 mL su ile tekrar yıkandı ve son olarak kartuşlardan 1 mL metanol geçirilerek süzüntü 10 mL hacimli balon jojelere aktarıldı. Balon jojeler %80 asetonitril çözeltisi ile 10 mL hacme tamamlandı. Elde edilen çözelti 0,45 µm filtreden geçirilerek cam viallere alındı ve HPLC-DAD ile analiz edildi.

Bal mumu numuneleri hazırlama; 2,5 g bal mumu 50 mL'lik polipropilen santrifüj tüplerine tartıldı ve her bir tüpe 12,5 mL n hekzan çözücüsü eklendi. Üzerine 10 µg/mL p-cumenol konsantrasyonlu internal standart çözeltisinden 1 mL eklendi. 1000 rpm hıza ayarlı mekanik karıştırıcıda 20 dk süre ile homojen çözelti haline gelmesi sağlandı. Ardından – 10 °C 4000 devir 10 dk süre ile santrifüj edildi. Oluşan üst fazdan 1 mL alınarak 10 mL'lik balon jojelere aktarıldı. Balon jojeler %80 asetonitril çözeltisi ile 10 mL hacme tamamlandı. Elde edilen çözelti 0,45 µm filtreden geçirilerek cam viallere alındı ve HPLC-DAD ile analiz edildi.

Kromatografik koşullar: Mobil faz akışı, A hattından %75 asetonitril, B hattından %25 su oranında ve 1 mL/dk hızda izokratik akış olarak ayarlandı. Tespit dalga boyu 277 nm, kolon fırını sıcaklığı 25 °C, numune enjeksiyon hacmi 20 µL, analiz süresi 7 dk olarak ayarlandı. Mobil faz, sisteme verilmeden önce 20 dk boyunca ultrasonik banyoda degaze edildi. Ardından vakum yardımı ile 0,45 µm filtreden geçirilerek süzüldü.

### **2.1.2. Analitik metodun geçerli kılınması çalışmaları**

Analitik metodun geçerli kılınması çalışmasında VICH kılavuzu (Anon, 1998) uyarınca; seçicilik, doğruluk, kesinlik, tespit limiti, kantitatif limit, doğrusallık, aralık, sağlamlık ve sistem uygunluk parametreleri ile ICH kılavuzu (Anon, 1995 ve Anon, 1996) çözelti stabilitesi parametreleri çalışıldı.

Seçicilik; uygulanan analitik metodun özel olarak sadece etkin maddenin miktarını ölçmede gösterdiği hassasiyet derecesidir. Burada analitik prosedürün hedeflenen amacına bağlı olarak uygulanan işlem, analitik metotta kullanılan kimyasalları temsilen kör numunesinin, hidrojelde kullanılan etkin madde dışındaki diğer maddeleri temsilen plasebonun, timol özütlemesinin yapıldığı diğer matriksler olan kovan içi hava, bal, bal mumu numunelerinin ve timol etkin maddesi ile yapısal açıdan yakın ilişkili olarak p-cumenol (Hajimehdipoor ve ark., 2010) ile etkileşimlerinin, test metodunun kontrol konsantrasyonu olan 10 µg/mL ile birlikte karşılaştırılması prensibine dayanmaktadır. İlgili matrikslerin HPLC-DAD sistemine enjeksiyonları gerçekleştirildi ve alıkonma zamanları bakımından etkileşim durumları incelendi.

Kesinlik: Sistemin tekrarlanabilirliği, bir analitik metodun, aynı laboratuvarında, aynı analist ve cihaz ile arka arkaya kısa bir zaman diliminde uygulanabilmesi ile alınan birden fazla test sonucunun birbirlerine yakınlık derecesinin ölçülmesi prensibine dayanır.

Sistemin tekrarlanabilirliği analizi için; kontrol konsantrasyonunda (10 µg/mL) hazırlanan standart solüsyonundan HPLC-DAD sistemine arka arkaya 10 enjeksiyon yapıldı. Enjeksiyonlar sonrası elde edilen alan değerlerinden %RSD hesaplandı. Sistem tekrarlanabilirlik parametresi için kabul kriteri gereği, hesaplanan %RSD değeri  $\leq 2$  olmalıdır (Anon, 2020b).

Metodun Tekrarlanabilirliği: Burada yapılan çalışma; ayrı ayrı hazırlanan standart ve numune solüsyonlarının analiz sonuçlarının birbirlerine yakınlık derecesinin ölçülmesi prensibine dayanır. Standart çözeltisi, hidrojel numunesi ve referans ilaç numunelerinden kontrol konsantrasyonunda (10 µg/mL ) ayrı ayrı 6 adet çözelti hazırlandı ve her birinden 3 kez enjeksiyon yapıldı. Bu çalışma sonunda her bir enjeksiyona karşılık gelen pik alanlarına göre etkin madde miktarları ve enjeksiyonlar arası %RSD hesaplandı. Burada hesaplanan %RSD değeri  $\leq 3$  olmalıdır (Anon, 2020b).

Laboratuvar içi üretilebilirlik (ara kesinlik/ intermediate precision); laboratuvar içi üretilebilirlik, çalışma yapılan örneğin analiz sonuçlarının çeşitli varyasyonlara göre değişmediğinin göstergesidir. Bu çalışmada, referans timol preparatı 10 µg/mL konsantrasyonunda farklı 2 günde, farklı 2 analist tarafından hazırlanarak farklı 2 HPLC cihazıyla analiz edildi. Analiz sonuçlarının %RSD değeri  $\leq 2$  olmalıdır (Shabir, 2004).

Doğrusallık; bir analitik metodun doğrusallığı, değişik konsantrasyonlarda analit içerecek şekilde hazırlanan numunelere ait analiz sonuçlarının konsantrasyon ile doğru orantılı olmasıdır. Doğrusallığın oluşturulması için en az 5 konsantrasyon önerilmektedir (Anon,1998).

Çalışmada timol konsantrasyon ölçümleri için balda 0,8 mg/kg kalıntı limiti (Bogdanov ve ark., 1998), havadaki timol konsantrasyonu sağaltım penceresi için 5-15 µg/L kovan içi hava limitleri bulunmaktadır. Teorik olarak numunelerde karşılaştırılması ön görülen bu değerleri kapsayacak şekilde, timol standart

maddesinden 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15 ug/mL konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı ve 3'er defa HPLC-DAD sistemine enjeksiyon yapıldı. Burada pik alanlarının oranlarına karşı konsantrasyon pilot eğrisi çizdirilerek hesaplanan korelasyon katsayısı en düşük kabul sınırı 0,995 dir (Anon, 2020b).

Tespit Limiti-Hesaplama Limiti (LOD-LOQ); tespit limiti, bir numunedeki tespit edilebilen ancak belirtilen deney koşulları altında nicel olarak ölçülmesi gerekmeyen en düşük analit miktarı, hesaplama limiti ise bir numunedeki uygun kesinlik ve doğrulukla nicel olarak belirlenebilen en düşük analit miktarı olarak tanımlanmaktadır (Anon,1995). Tespit ve hesaplama limiti hesaplaması, görsel değerlendirme ile, S/N oranına dayalı yaklaşımla, ve kalibrasyon eğrisi verilerinin regresyonu ile hesaplanabilmektedir (Shrivastava ve Gupta, 2011). Tespit edilen bu teorik limitlerin doğrulaması için hesaplanan LOQ seviyesinde hazırlanan standart HPLC-DAD sistemine 6 kez enjekte edildi ve ölçülen alan değerleri arasında ki RSD değerinin %10 dan fazla olmaması kriterine göre değerlendirildi (Shabir, 2004).

Aralık (sınırlar/range); doğrusallık parametresinde çalışılan konsantrasyonlar aralığı da kapsamaktadırlar. Bu sebeple aralık parametresi normal olarak doğrusallık çalışmalarından türetilmektedir. Analitik prosedürün, belirtilen aralığının içinde veya dışında kalan miktarlarda analit içeren numunelere uygulandığında kabul edilebilir derecede bir doğrusallık, doğruluk ve hassasiyet sağladığını kanıtlamak için araştırılır. Bir ilaç etkin maddesinin veya bitmiş ürünün miktar tayini için, en az test konsantrasyonunun %80 ila %120'si aralık parametresi için çalışılmaktadır. Aralık çalışmasında 10 µg/mL kontrol konsantrasyonu (%100) için %80-%120 konsantrasyonları için elde edilen timol konsantrasyon alanları %RSD değerleri  $\leq 3,0$  olmalıdır (Shabir, 2004).

Doğruluk; bir analitik metodun doğruluğu, araştırılan analit için elde edilen test sonuçlarının gerçek değere olan yakınlığıdır. Doğruluk ya da diğer bir deyişle geri kazanım çalışması, bilinen konsantrasyonlarda analitin plasebo ya da kör

matrikslere uygulanması ve hemen ardından yapılan analizler sonucu elde edilen verilerin karşılaştırılması ile hesaplanmaktadır. Bu çalışmada timol analiti miktar tayini hesaplamasında doğruluk ya da diğer bir deyişle geri kazanım çalışmasının gerçekleştirilmesi için; hidrojelde kullanılan etkin madde dışındaki diğer maddeleri temsilen plaseboya, salımın gerçekleştirildiği ortam olan kovan içi havaya ve kalıntı miktarlarının araştırılacağı bal, bal mumu matrisklerine bilinen konsantrasyonlarda timol etkin maddesi yüklemesi yapıldı.

Bitmiş ürün olarak değerlendirilen hidrojin, 10 µg/mL için, en az %80-120'si aralığını içeren düzeyinden yola çıkılarak 3 noktada (%80, %100 ve %120) 9 ölçüm yapıldı (Anon, 1998 ve Anon, 2020b).

*In vitro* ortam kovan içi hava numunesinin geri kazanımı için; hedeflenen 5-15 µg/L kovan içi hava sağıltıcı doz aralığından yola çıkılarak 144 dk boyunca 0,42 L/dk örnekleme süre ve debisi göz önüne alındığında 500 mL hacimli gaz yıkama şişesinde teorik olarak tutulması beklenen konsantrasyonlar bakımından bir değerlendirme yapıldı. Bahsedilen sağıltıcı doz orta noktası olan 10 µg/L hava konsantrasyonundan hareketle, *in vitro* salım her örnekleme ve analiz noktası için 144 dk süre ve 0,42 L/dk debi ile 500 mL hacimde teorik olarak %100 geri kazanımla 1,2096 µg/mL timol konsantrasyonuna sahip %10 1 metil 2 pirrolidon çözeltisi oluşacaktır. Bu bilgi doğrultusunda *in vitro* salım geri kazanımı için altı noktada (0,25; 0,5; 1; 5; 10; 20 µg/mL) 18 ölçüm ile geri kazanım çalışması yapıldı (Anon, 2016a).

Kör olduğu bilinen bal ve balmumu numunelerine, 0,8 mg/kg balda kalıntı referans miktarı için, en az %80-120'si aralığını içeren düzeyinden yola çıkılarak dört (Floris ve ark., 2004) noktada (0,25; 0,5; 1 µg/mL) 9 ölçüm, yapılarak gerçekleştirildi.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmada doğruluk parametresi, timol miktar tayini gerçekleştirilecek tüm numuneler bakımından geri kazanım limitlerine

uygunluğu değerlendirildi. Bitmiş tırın olarak değerlendirilen hidrojel için Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından %95-105 aralığı olarak (Anon, 2020b), kovan içi hava numunesi, bal ve balmumu numunelerinde oluşturulan yikleme düzeyleri (100 µg/kg-10 mg/kg) dikkate alındığında ise Resmi Tarım Kimyagerleri Derneği (AOAC) (Anon, 2016b) rehberine göre %80-110 aralığı olarak limitler belirlendi. Yüzde geri kazanım oranı her konsantrasyon düzeyi için ayrı ayrı aşağıdaki eşitlik ile hesaplandı.

$$\text{Geri kazanım (\%)} = \frac{\text{Test sonucu bulunan konsantrasyon}}{\text{Gerçek Konsantrasyon}} \times 100$$

Doğruluk kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması:

Stok p-cumenol internal standart çözeltisi (10 µg/mL) hazırlanması; 100 mL’lik balon jojeye yaklaşık olarak 10 mg tartılan p-cumenol standardı saf asetonitril ile 100 mL hacme tamamlandı. Bu zeltiden 1 mL alınarak 10 mL balon jodede %80 asetonitril ile 10 mL hacme tamamlandı. 1000 rpm hıza ayarlı mekanik karıştırıcıda 20 dk süre ile çözünmesi sağlandı.

Stok timol standart çözeltisi-1 (10 µg/mL) hazırlanması; 100 mL’lik balon jojeye yaklaşık olarak 10 mg tartılan timol standardı saf asetonitril ile 100 mL hacme tamamlandı. Bu zeltiden 1 mL alınarak 10 mL balon jodede %80 asetonitril ile 10 mL hacme tamamlandı. 1000 rpm hıza ayarlı mekanik karıştırıcıda 20 dk süre ile çözünmesi sağlandı.

Stok timol standart çözeltisi-2 (500 000 µg/mL) hazırlanması; 10 mL’lik balon jojeye yaklaşık olarak 5 g timol standardı tartıldı ve ayçiçek yağı ile 10 mL hacme tamamlandı. Ultrasonik banyoda 20 dk süre ile çözünmesi sağlandı.

Hidrojel için plasebo ve doğruluk kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması: Her bir doğruluk çalışma noktası için 15 mL hacimli kapaklı tüpler içerisine %10

jelatin çözeltisinden 5 mL konuldu. Plasebo numunesi için timol içermeyen ayçiçek yağından 1 mL ve %80, %100 ve %120'lik doğruluk numuneleri için stok timol standart 2 çözeltisinden sırasıyla 0,8 mL, 1 mL ve 1,2 mL eklendi. Tüm numunelere 0,8 mL %12,5 glutaraldehit çözeltisinden eklendi ve 1000 rpm devirde vorteks ile 2 dk boyunca çalkalanarak çapraz bağlamanın gerçekleşmesi sağlandı. Bir gece tüpler içerisinde bekletilen hidrojeller daha sonra tüplerden çıkarılarak 0,5 cm kalınlıkta diskler şeklinde kesildi ve çapraz bağlanmaya girmeyen jelatin ile glutaraldehitin uzaklaştırılması için distile suyla 3 kez art arda yıkandı. Elde edilen diskler sırasıyla 24 saat oda koşullarında ve sonrasına ise 30 °C sıcaklığa ayarlanan etüvde sabit ağırlığa gelene kadar kurutmaya bırakıldı. Kuruyan hidrojeller bistürü yardımıyla mekanik olarak küçük parçalara ayrıldı ve 250 mL balon joje içerisine alınarak üzerlerine 100 mL asetonitril konuldu. Balon jojeler 70 °C sıcaklığa ayarlı su banyosunda 1 saat bekletildi. Daha sonra soğumaya bırakılan balon jojeler 250 mL hacme kadar asetonitril ile tamamlandı. Balon jojelerden 1 mL çözelti alınarak 200 mL balon jojelere konuldu ve %80 asetonitril çözeltisi ile 200 mL hacme tamamlandı. Elde edilen çözelti 0,45 µm filtreden geçirilerek cam viallere alındı ve HPLC-DAD ile analiz edildi. Tüm numuneler üçer kez enjekte edildi. 500 000 µg/mL timol konsantrasyonlu stok çözeltiden 8 µg/mL, 10 µg/mL ve 12 µg/mL timol konsantrasyonlu kalibrasyon düzeyleri oluşturuldu.

Bal için kör numune ve doğruluk kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması: Literatürde yer alan metotlardan (Bogdanov ve ark., 1998 ve Martel ve Zeggane, 2002) hareketle ve bazı değişiklikler yapılarak çalışma gerçekleştirildi. Her bir doğruluk çalışma noktası için 2,5 g bal 50 mL'lik polipropilen santrifüj tüplerine tartıldı ve üzerlerine 7 mL distile su eklendi. Ardından kör numunesi ve diğer kalibrasyon noktaları için asetonitrilde hazırlanan 10 µg/mL p-cumenol konsantrasyonlu internal standart çözeltisinden 1 mL eklendi. 0,25; 0,5; 1 µg/mL kalibrasyon düzeyleri için asetonitrilde hazırlanan 10 µg/mL timol konsantrasyonlu çözeltisinden sırası ile 0,25; 0,5; 1 mL tüplere eklendi. 1000 rpm hıza ayarlı mekanik karıştırıcıda 20 dk süre ile homojen çözelti haline gelmesi sağlandı. 6 mL metanol ve 6 mL su ile aktive edilen SPE kartuştan (SiliaPrep™) numuneler geçirildi. SPE kartuşlar ardında 6 mL su ile tekrar yıkandı ve son olarak 1 mL

metanol ile kartuşlarda tutunan timol ve p-cumenol 10 mL hacimli balon jojelere aktarılması sağlandı. Balon jojeler %80 asetonitril çözeltisi ile 10 mL hacme tamamlandı. Elde edilen çözelti 0,45 µm filtreden geçirilerek cam viallere alındı ve HPLC-DAD ile analiz edildi. Tüm numuneler üçer kez enjekte edildi. 100 µg/mL timol konsantrasyonlu stok çözeltiden 1 µg/mL p-cumenol içeren 0,25; 0,5; 1 µg/mL timol konsantrasyonlu kalibrasyon düzeyleri oluşturuldu.

Bal mumu için kör numune ve doğruluk kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması: Kolonilerde varroosis mücadelesi amaçlı timol kullanımı sonucunda balda olduğundan daha fazla oranda timolün bal mumunda biriktiği belirtildi (Bogdanov, 2005). Bal mumunda timol kalıntısı ile ilgili yasal bir limit bulunmamakla birlikte, timolün birikimi ve koloni ve arıcılık ürünlerine yeniden dağılım gösterme özelliği nedeniyle bal mumu içinde miktar tayini gerçekleştirildi. Bal için belirlenen geri kazanım çalışması esas alınarak bazı değişiklikler ile birlikte çalışma bal mumu içinde gerçekleştirildi. Özütleme İçin Jamal ve ark. (2020), metodundan hareketle ve bazı değişiklikler yapılarak çalışma gerçekleştirildi. Her bir doğruluk çalışma noktası için 2,5 g bal mumu 50 mL'lik polipropilen santrifüj tüplerine tartıldı ve her bir tüpe 10 mL n hekzan çözücüsü eklendi. Ardından kör numunesi ve diğer kalibrasyon noktaları için asetonitrilde hazırlanan 10 µg/mL p-cumenol konsantrasyonlu internal standart çözeltisinden 1 mL eklendi. 0,25; 0,5; 1 µg/mL kalibrasyon düzeyleri için asetonitrilde hazırlanan 10 µg/mL timol konsantrasyonlu çözeltiden sırası ile 0,25; 0,5; 1 mL tüplere eklendi. 1000 rpm hıza ayarlı mekanik karıştırıcıda 20 dk süre ile homojen çözelti haline gelmesi sağlandı. Ardından -10 °C 4000 devir 20 dk süre ile santrifüj edildi. Oluşan üst faz 0,45 µm PTFE filtreden süzülerek farklı bir santrifüj tüpüne alındı. Süzüntü -10 °C 4000 devir 20 dk süre ile santrifüj edildi. Üst faz 0,45 µm PTFE filtreden süzülerek 10 mL'lik balon jojelere aktarıldı. Balon jojeler %80 asetonitril çözeltisi ile 10 mL hacme tamamlandı. Elde edilen çözelti 0,45 µm PTFE filtreden geçirilerek cam viallere alındı ve HPLC-DAD ile analiz edildi. Tüm numuneler üçer kez enjekte edildi. 10 µg/mL timol konsantrasyonlu stok çözeltiden 1 µg/mL p-cumenol içeren 0,25; 0,5; 1 µg/mL timol konsantrasyonlu kalibrasyon düzeyleri oluşturuldu.

*İn vitro* salımın gerçekleştirildiği kovan içi hava için kör numunesi ve doğruluk kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması: Her bir doğruluk çalışma noktası için 10 mL’lik balon jojelere kör numunesi ve diğer kalibrasyon noktaları için asetronitrilde hazırlanan 10 µg/mL p-cumenol konsantrasyonlu internal standart çözeltilisinden 1 mL eklendi. 0,25; 0,5; 1; 5; 10; 15 µg/mL kalibrasyon düzeyleri için asetronitrilde hazırlanan 100 µg/mL timol konsantrasyonlu çözeltiden sırası ile 0,025; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 1,5 mL tüplere eklendi. Balon jojeler % 10 n metil 2 pirrolidon çözeltisi ile 10 mL hacme tamamlandı. 1000 rpm hıza ayarlı mekanik karıştırıcıda 20 dk süre ile homojen çözelti haline gelmesi sağlandı. Son olarak elde edilen çözelti 0,45 µm PTFE filtreden geçirilerek cam viallere alındı ve HPLC-DAD ile analiz edildi. Tüm numuneler üçer kez enjekte edildi. 100 µg/mL timol konsantrasyonlu stok çözeltiden sonuç olarak 1 µg/mL p-cumenol içeren kör- 0,25; 0,5; 1; 5; 10; 15 µg/mL timol konsantrasyonlu hava kalibrasyon düzeyleri oluşturuldu.

**Sağlamlık:** Bir analitik metodun sağlamlığı, analiz parametrelerinde oluşabilecek çeşitli değişimlerin analitik metotla üretilen sonuçların güvenilirliğini etkilemediğini göstermek için araştırılır. Sıvı kromatografik analitik metodun sağlamlığını test etmek için; mobil faz akış miktarı, tampon çözelti pH sı, tampon çözelti konsantrasyonu, mobil fazdaki organik çözücü oranı, kolon sıcaklığı, farklı kolonlar (farklı partiler ve / veya tedarikçi) ve dedektör dalga boyunda yapılacak değişimlerinin potansiyel olarak analiz sonuçları üzerinde etkisinin araştırılması önerilmektedir (Heyden ve ark., 2001). Bu sekiz bileşenden en az 3 tanesinin faktöriyel tasarımıyla değerlendirilmesi uygun görülmektedir. Timolün sıvı kromatografik tekniklerle miktar tayini için geliştirdikleri metotta sağlamlık testi için oluşturulan faktöriyel tasarımdan (Angelo ve ark., 2016) yola çıkılarak mobil faz akış miktarı, mobil fazdaki organik çözücü oranı ve kolon sıcaklığı bileşenlerinde yapılan değişikliklerle test gerçekleştirildi. Sonuçlar arasında %RSD < 2,0 olmalıdır (Paithankar, 2013).

**Sistem Uygunluk:** Kromatografik çalışmalarda, metotta yer alan numune, ekipman, yazılım vb. tüm bileşenlerinin oluşturduğu sistemin amaçlanan analiz için

uygun şekilde çalışıp çalışmadığının belirli test prosedürleri ile doğrulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla kontrol konsantrasyonu olan 10 µg/mL timol ve 10 µg/mL p-cumenol standartlarından hazırlanan çözeltiden HPLC-DAD sistemine ardışık 6 enjeksiyon gerçekleştirildi. Kromatografik yazılım ile hesaplanan alıkonma zamanı, pik alanı, pik yüksekliği için kesinlik çalışması, kolon plaka kat sayısı (N), çözünürlük (Resolution: R<sub>s</sub>), USP pik kuyruklanma faktörü (peak tailing faktör: T) ve kapasite faktörü (K') test parametreleri kabul kriterleri bakımından değerlendirildi (Anon, 2016c ve Shabir, 2004).

Çözelti Stabilitesi: ICH kılavuzlarında (Anon, 1995 ve Anon, 1996) belirtildiği gibi, analitik çözeltilerin stabilitesi, sağlamlık testi sırasında değerlendirilmesi gereken tipik bir değişkendir. Oda koşullarında ve buzdolabı koşullarında muhafaza edilen kontrol konsantrasyonundaki (10 µg/mL) timol standart çözeltisinden ve *in vitro* salım sistemi 10 µg/mL timol konsantrasyonundaki kovan içi hava doğruluk çözeltisinden belirli aralıklarla HPLC-DAD sistemine enjeksiyonlar gerçekleştirildi. Enjeksiyonlar için elde edilen pik alanları arası fark aşağıdaki eşitlikler ile hesaplandı. Stabilitate kabulü için fark en fazla %2 olmalıdır.

Standart çözeltisi (Std. Ç.) için hesaplama:

$$\text{Fark (\%)} = \frac{\text{Std. Ç. İlk Enj. Pik Alanı} - \text{Std. Ç. Son Enj. Pik Alanı}}{\text{Std. Ç. İlk Enj. Pik Alanı}} \times 100$$

Numune çözeltisi (Num. Ç.) için hesaplama:

$$\text{Fark (\%)} = \frac{\text{Num. Ç. İlk Enj. Pik Alanı} - \text{Num. Ç. Son Enj. Pik Alanı}}{\text{Num. Ç. İlk Enjeksiyon Pik Alanı}} \times 100$$

## **2.2. Kontrollü Salım Sistemi İçin Biyouyumlu Polimerler İle Hidrojel Hazırlanması**

Çalışmanın bu aşamasında hidrojel hazırlama tekniği kullanılarak; jelatin, Na-Aljinat ve karboksi metil selüloz (CMC) polimerleri ile glutaraldehit,  $\text{CaCl}_2$  ve  $\text{FeCl}_3$  bağlayıcılarının farklı konsantrasyonlarından oluşan farklı özelliklere sahip alternatif hidrojel serileri hazırlanması amaçlandı. Ayrıntılar aşağıdaki alt başlıklarda sunuldu.

### **2.2.1. Jelatin hidrojellerin hazırlanması**

Materyal olarak; toz halde sığır jelatini (Gıda kalitesi, Alfasol), glutaraldehit %25 (Merck) ve distile su kullanıldı. İki farklı derişimde jelatin çözeltisi hazırlandı. %8'lik 200 mL jelatin çözeltisi hazırlamak için 16 g, %10'luk 200 mL çözelti hazırlamak için 20 g jelatin tartılarak 500 mL'lik mobil faz şişelerine konuldu ve üzerlerine 200 mL distile su eklendi. Sonrasında jelatinin çözünmesi için 50 °C sıcaklığa ayarlı ultrasonik banyoda bir saat bekletildi. Çözünme ardından %8'lik jelatin çözeltilerinden 35 adet 15 mL hacimli ve kapaklı tüpe, 5 mL çözelti konuldu. 35 tüp beşerli 7 gruba ayrıldı. Çapraz bağlanma reaksiyonu için, %25'lik glutaraldehit çözeltisi yarı yarıya distile su ile seyreltilerek %12,5'lik glutaraldehit çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltden yedi gruptaki tüplere sırasıyla 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 2,4; 3,2; ve 4 mL konuldu. Aynı işlem %10 jelatin çözeltisi içeren yedi gruptaki 35 tüpe de uygulandı. Tüplere glutaraldehit çözeltileri eklenir eklenmez kapakları kapatılarak vortekse yerleştirildi ve 1000 devirde 2 dk süreyle karıştırılması sağlandı. Sonrasında tüpler oda koşullarında 24 saat bekletildi. 24 saat sonunda kapakları açılarak spatül yardımıyla hidrojeller tüpten çıkarıldı. Hidrojeller bistüri yardımıyla 0,5 cm kalınlığındaki diskler halinde kesildi. Elde edilen diskler çapraz bağlanma reaksiyonuna girmeyen jelatin ve glutaraldehidin uzaklaştırılması için distile su içerisinde üç kez art arda yıkandı. 24 saat oda koşullarında bekletilen hidrojel kesitleri sonra 30 °C sıcaklığa ayarlı etüve kondu. Hidrojel kesitleri sabit ağırlığa gelene kadar hassas terazi (AK160, Mettler Toledo, Ohio, ABD) ile tartıldı.

Hazırlanan hidrojel ve hazırlama koşulları çizelge 2.1. de sunuldu.

**Çizelge 2.1.** Jelatin Hidrojeli Hazırlama Koşulları.

| JEL KODU | Jelatin Çözeltisi |    |     | Glutaraldehit Çözeltisi |     |       | Glutaraldehit/Jelatin Oranı |
|----------|-------------------|----|-----|-------------------------|-----|-------|-----------------------------|
|          | %                 | mL | g   | %                       | mL  | g     |                             |
| JJ1      | 8                 | 5  | 0,4 | 12,5                    | 0,2 | 0,025 | 0,0625                      |
| JJ2      | 8                 | 5  | 0,4 | 12,5                    | 0,4 | 0,05  | 0,125                       |
| JJ3      | 8                 | 5  | 0,4 | 12,5                    | 0,8 | 0,1   | 0,25                        |
| JJ4      | 8                 | 5  | 0,4 | 12,5                    | 1,6 | 0,2   | 0,5                         |
| JJ5      | 8                 | 5  | 0,4 | 12,5                    | 2,4 | 0,3   | 0,75                        |
| JJ6      | 8                 | 5  | 0,4 | 12,5                    | 3,2 | 0,4   | 1                           |
| JJ7      | 8                 | 5  | 0,4 | 12,5                    | 4   | 0,5   | 1,25                        |
| JJ8      | 10                | 5  | 0,5 | 12,5                    | 0,2 | 0,025 | 0,05                        |
| JJ9      | 10                | 5  | 0,5 | 12,5                    | 0,4 | 0,05  | 0,1                         |
| JJ10     | 10                | 5  | 0,5 | 12,5                    | 0,8 | 0,1   | 0,2                         |
| JJ11     | 10                | 5  | 0,5 | 12,5                    | 1,6 | 0,2   | 0,4                         |
| JJ12     | 10                | 5  | 0,5 | 12,5                    | 2,4 | 0,3   | 0,6                         |
| JJ13     | 10                | 5  | 0,5 | 12,5                    | 3,2 | 0,4   | 0,8                         |
| JJ14     | 10                | 5  | 0,5 | 12,5                    | 4   | 0,5   | 1                           |

### 2.2.2. Na-Aljinat hidrojellerin hazırlanması

Materyal olarak; toz halde Na-Aljinat polimeri (Gıda kalitesi, Alfamol),  $\text{CaCl}_2$  (Merck) ve %45  $\text{FeCl}_3$  (Sigma Aldrich) ve distile su kullanıldı. %7'lik 100 mL çözelti için 7 g Na-Aljinat tartıldı. 500 mL'lik mobil faz şişelerine konuldu ve üzerlerine 100 mL distile su eklendi. Sonrasında Na-Aljinat çözünmesi için 50 °C sıcaklığa ayarlı manyetik karıştırıcıda altı saat bekletildi. Çözünme ardından %7'lik Na-Aljinat çözeltisi oda sıcaklığına gelmesinin ardından rulo haline getirilip – 18 °C sıcaklığa ayarlı soğutucuda 2 saat bekletilerek yapının sertleşmesi sağlandı. Soğutucudan alınan rulo bistüri yardımıyla 1 cm kalınlıkta diskler halinde kesildi. Elde edilen diskler iki gruba ayrıldı. Birinci grup için çapraz bağlayıcı olarak %5, %10 ve %20 konsantrasyonlu  $\text{FeCl}_3$ 'ün suda hazırlanan 250 mL hacimli çözeltileri kullanıldı. Birinci grupta yer alan disklerden beşer adet alınarak sırasıyla %5'lik, %10'luk ve %20'lik  $\text{FeCl}_3$  çözeltilerinin her birinde 5, 10 ve 20 dk süreyle manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çapraz bağlanmanın gerçekleşmesi sağlandı. Aynı işlemler ikinci grup örneklerden beşer adet alınarak  $\text{CaCl}_2$  çözeltisinde tekrarlandı. Elde edilen hidrojel diskleri distile su içerisinde üç kez art arda yıkanarak çapraz bağlanma reaksiyonuna girmeyen Na-Aljinat,  $\text{FeCl}_3$  ve  $\text{CaCl}_2$ 'ün uzaklaştırılması

sağlandı. Yıkama işleminden sonra 24 saat boyunca oda koşullarında bekletilen hidrojel kesitleri daha sonra 30 °C sıcaklıktaki etüve kaldırıldı. Hassas terazi (AK160, Mettler Toledo, Ohio, ABD) ile yapılan tartımlarla hidrojel kesitlerinin sabit ağırlığa gelene kadar kurumaları sağlandı.

### 2.2.3. Karboksi metil selüloz hidrojellerin hazırlanması

Materyal olarak; toz halde CMC polimeri (Gıda kalitesi, Alfamol),  $\text{CaCl}_2$  (Merck) ve %45  $\text{FeCl}_3$  (Sigma Aldrich) ve distile su kullanıldı. %7'lik 100 mL çözelti için 7 g CMC tartıldı. 500 mL'lik mobil faz şişelerine konuldu ve üzerlerine 100 mL distile su eklendi. Sonrasında CMC çözünmesi için 50 °C sıcaklığa ayarlı manyetik karıştırıcıda altı saat bekletildi. Çözünme ardından %7'lik CMC çözeltisi oda sıcaklığına gelmesinin ardından rulo haline getirilip - 18 °C ayarlı soğutucuda 2 saat bekletilerek yapının sertleşmesi sağlandı. Soğutucudan alınan rulo bistüri yardımıyla 1 cm kalınlıkta diskler halinde kesildi. Elde edilen diskler iki gruba ayrıldı. Birinci grup için çapraz bağlayıcı olarak %5, %10 ve %20 konsantrasyonlu  $\text{FeCl}_3$ 'ün suda hazırlanan 250 mL hacimli çözeltileri kullanıldı. Birinci grupta yer alan disklerden beşer adet alınarak sırasıyla %5'lik, %10'luk ve %20'lik  $\text{FeCl}_3$  çözeltilerinin her birinde 5, 10 ve 20 dk süreyle manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çapraz bağlanmanın gerçekleşmesi sağlandı. Aynı işlemler ikinci grup örneklerden beşer adet alınarak  $\text{CaCl}_2$  çözeltisinde tekrarlandı ve ek olarak elde edilen disklerden beşer adet, %30'luk  $\text{CaCl}_2$  çözeltisinde 10, 20 ve 30 dk süreyle çapraz bağlanma sağlanması için manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Elde edilen hidrojel diskleri distile su içerisinde üç kez art arda yıkanarak çapraz bağlanma reaksiyonuna girmeyen CMC,  $\text{FeCl}_3$  ve  $\text{CaCl}_2$ 'ün uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama işleminden sonra 24 saat boyunca oda koşullarında bekletilen hidrojel kesitleri daha sonra 30 °C sıcaklıktaki etüve kaldırıldı. Hassas terazi (AK160, Mettler Toledo, Ohio, ABD) ile yapılan tartımlarla hidrojel kesitlerinin sabit ağırlığa gelene kadar kurumaları sağlandı.

### 2.3. Hidrojellerin Şişme Özelliklerinin İncelenmesi

Hidrojel disk ve kesitlerinin şişme testleri gravimetrik olarak yapıldı. Kurutulan ve sabit tartıma gelen jelatin, Na-Aljinat ve CMC hidrojel diskleri içerisinde 100 mL distile su bulunan numune kaplarına konuldu ve kapların kapakları kapatılarak 30 °C ayarlı etüve kaldırıldı. Şişmiş hidrojel disk ve kesitleri 48 saat boyunca belirli aralıklarda sudan çıkarılarak filtre kağıdı ile kurutuldu, hassas terazide tartıldı ve tekrardan numune kaplarındaki suya bırakıldı. Elde edilen tartım değerleri kayıt altına alındı. Üçer örnek üzerinden yürütülen çalışmalardan ortalama yüzde şişme değerleri (%Ş) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Ş (\%)} = \frac{(m_w - m_d)}{m_d} \times 100$$

Burada  $m_d$ : Hidrojel diski kuru ağırlığı,  $m_w$ : Hidrojel diski yaşı ağırlığıdır. Ayrıca şişme testleri öncesi, sırası ve sonrasında hidrojellerin yapı görünümü ve sağlamlıkları görsel olarak takip edilerek kayıt altına alındı.

### 2.4. Hidrojellerin Timol Yüklenebilme Özelliklerinin İncelenmesi

Jelatin, Na-Aljinat ve CMC hidrojel disk ve kesitlerinin şişme testleri öncesinde jel oluşumunun gerçekleşmesi, yapının görünüm ve sağlamlığı, şişme testlerinde sırasında ve sonrasında ise hidrojin yüksek düzeyde şişme kapasitesi göstermesi ve yapının görünüm ve sağlamlığının sürdürülmesi bakımından değerlendirmeler yapıldı. Belirtilen özellikleri sağlayan iki adet jelatin hidrojel ile timol etkin maddesi yükleme testlerine geçildi. Seçilen her bir hidrojel için timol etkin maddesinden katı halde 3 farklı düzeyde ve 1:1 oranında ayçiçek yağı içerisinde çözülmüş halde 3 farklı düzeyde olmak üzere toplamda 6 farklı şekilde timol yükleme gerçekleştirildi.

Jelatin hidrojeline timol yüklenmesi: Jelatin hidrojellerin hazırlanması kısmında belirttiği şekliyle 300 mL hacimli %8'lik ve %10'luk jelatin çözeltileri hazırlandı. %8 konsantrasyonlu jelatin çözeltisinden 60 adet 15 mL hacimli ve kapaklı tüpe 5'er mL çözelti konuldu. Bu 60 tüpten her biri beş tüp içeren 12 grup oluşturuldu. Her bir grupta yer alan tüplere sırasıyla 0,5 g, 1 g ve 1,5 g toz timol ve 1:1 oranında ayçiçek yağı-timol çözeltisinden 1 mL, 2 mL ve 3 mL olacak şekilde eklendi. Çözeltiler 2000 devirde 20 dk süreyle vorteks ile karıştırıldı. Ardından tüm tüplere %12,5 glutaraldehit çözeltisinden 0,8 mL konuldu. Tüplere glutaraldehit çözeltileri eklenir eklenmez kapakları kapatılarak vortekse yerleştirildi ve 2000 devirde 2 dk karıştırılması sağlandı. Karıştırma işlemi tamamlanan tüpler oda koşullarında 24 saat bekletildi. Aynı işlem %10 jelatin çözeltisi içeren 12 gruptaki tüplere de uygulandı. 24 saat sonunda tüplerin kapakları açılarak spatül yardımıyla hidrojeller tüpten çıkarıldı. Hidrojeller bistüri yardımıyla 0,5 cm kalınlığındaki diskler halinde kesildi. Elde edilen diskler çapraz bağlanma reaksiyonuna girmeyen jelatin ve glutaraldehitin uzaklaştırılması için distile su içerisinde üç kez art arda yıkandı. Yıkama işleminden sonra 24 saat boyunca oda koşullarında bekletilen hidrojel kesitleri daha sonra 30 °C sıcaklığa ayarlı etüve kaldırıldı. Hassas terazi (AK160, Mettler Toledo, Ohio, ABD) ile yapılan tartımlarla hidrojel kesitlerinin sabit ağırlığa gelene kadar kurumaları sağlandı. Hidrojeller, ileri aşamalarda gerçekleştirilecek testlere kadar çevresel dış etkenlerden korunması ve etkin madde kaybının engellenmesi için kilitli hava ve ışık geçirmez primer ambalajlarda 25 °C altında buzdolabına konulmadan ve dondurulmadan muhafaza edildi (Anon., 2005 ve Anon., 2018d)

Yükleme yapılan hidrojellerin yapı görünümü ve sağlamlıkları görsel olarak takip edilerek kayıt altına alındı. Hidrojellerin timol yüklenebilme kapasiteleri birim ağırlığı başına yüklenen ilaç miktarını ifade etmektedir ve hidrojeller tarafından tutulan toplam timol miktarının toplam hidrojel ağırlığına bölünmesiyle aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmaktadır.

$$\text{Yüklenebilme Kapasitesi (\%)} = \frac{\text{Hidrojelde tutulan timol miktarı}}{\text{Toplam Hidrojel Ağırlığı}} \times 100$$

Etüvde kurutma sonrası sabit tartım ağırlığına gelen timol yüklü jelatin-hidrojel disklerinin, her bir grubundan ayrı ayrı olmak üzere alınan numuneler bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. 15 mL hacimli kapaklı tüplere 100 mg ağırlığında numuneler tartıldı. Tüplere 10 mL asetonitril çözeltisi konuldu. Tüpler kapakları kapatılarak 70 °C sıcaklıktaki su banyosunda bir saat bekletildi. Ardından su banyosundan çıkarılarak oda sıcaklığına kadar soğuması için beklendi. Enjektör yardımıyla her tüpten bir mL çözelti alınarak, 0,45 µm filtreden geçirildi ve 15 mL hacimli kapaklı başka bir tüpe aktarıldı. Bu tüpler üzerine 9 mL %80 asetonitril çözeltisi konuldu. Vorteks ile 3 dk boyunca karıştırılan tüplerden 0,1 mL alınarak 15 mL hacimli kapaklı başka bir tüpe aktarıldı. Bu tüpler üzerine 9,9 mL %80 asetonitril çözeltisi konuldu. Vorteks ile 3 dk boyunca karıştırılan tüplerden son olarak enjektör yardımıyla 1 mL numune alınarak 0,45 µm PTFE filtreden geçirilip cam viallere aktarıldı. Ardından numunelerin HPLC-DAD ile timol miktar tayini için analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen ham veriler, başlangıç hidrojel birim ağırlığı ve başlangıç timol içeriğine göre düzenlenerek % timol yüklenebilme değerleri karşılaştırıldı.

## **2.5. Hidrojellerin Karakterizasyonu ve Morfolojisinin İncelenmesi**

Yükleme çalışması sonrası seçilen 1:1 oranında ayçiçek yağında çözdürülmüş timol yüklü glutaraldehit ile çapraz bağlı jelatin hidrojelinde karakterizasyon ve morfoloji incelemeleri gerçekleştirildi.

### **2.5.1. Hidrojel yapısının FT-IR ile incelenmesi**

Hidrojel yapıdaki çapraz bağlama reaksiyonunun doğrulanması için fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) analizi gerçekleştirildi. Kimyasal bir tepkime olan, jelatin polimerinin glutaraldehit ile çapraz bağlanması işlemi çoğunlukla jelatin içindeki birincil amin grupları (N-H) bölgesinde meydana gelmektedir (You ve ark., 2016). Bu kimyasal reaksiyon sonucu jelatinin amino grupları ile glutaraldehitin aldehit grupları arasındaki aldimin bağı (CH=N)

şekillenmekte ve aldimin gruplarının karakteristik absorpsiyonu  $1450\text{ cm}^{-1}$ 'de ortaya çıkmaktadır (Korkmaz ve ark., 2014).

Çalışmada, jelatin ile glutaraldehit arasında gerçekleşmesi beklenen kimyasal yapıları gözlemlemek ve hidrojele yüklenen timolün yapıdaki varlığını araştırmak için FT-IR spektroskopisi (Spectrum Two, Perkin Elmer) kullanıldı. Sırasıyla çapraz bağlanmamış jelatin polimeri, glutaraldehit ile çapraz bağlanan jelatin hidrojel ve 1:1 oranında ayçiçek yağında çözündürülmüş timol yüklü glutaraldehit ile çapraz bağlı jelatin hidrojelinin spektrumu  $450\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$  aralığında spektrumları kaydedildi ve numunelerin spektrumları, yapılarındaki kimyasal bağların varlığı ve düzeyi bakımından karşılaştırıldı.

#### **2.5.2. Hidrojel yapısının taramalı elektron mikroskobu ile incelenmesi**

Oluşturulan jelatin hidrojelinin morfolojisi, yüzey topografisi ve mikro yapılarının belirlenmesi için taramalı elektron mikroskobu ile incelemeler yapıldı. Bu amaçla jelatin hidrojeline timol yüklenmesi kısmında belirtildiği şekliyle iki adet numune hazırlandı. Birinci numune, jelatin polimeri glutaraldehit çapraz bağlayıcısı ve ayçiçek yağı içeren bir plasebo hidrojel olarak 50 mL hacimli kapaklı tüpte üretildi. İkinci numune, jelatin polimeri, glutaraldehit çapraz bağlayıcısı ve ayçiçek yağında çözündürülmüş timol içeren bir test hidrojel olarak 50 mL hacimli kapaklı tüpte üretildi. Üretilen hidrojeller 24 saat sonra tüplerden çıkarıldı, bir bistüri yardımıyla 1 cm kalınlıkta disk şeklinde kesitler oluşturuldu. Bu kesitler üç kez art arda distile su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen jelatin polimeri ve glutaraldehit kalıntılarının uzaklaştırılması sağlandı. Mikro yapıların daha iyi incelenebilmesi için bu hidrojel kesitleri 48 saat süreyle içerisinde distile su bulunan 100 mL hacimli kapaklı numune kaplarında oda sıcaklığında şişmeye bırakıldı. Ardından taramalı elektron mikroskobu ile incelenmeleri öncesinde altınla kaplanabilmesi için kuru olmaları gerektiğinden liyofilizasyon işlemine tabi tutuldu (Kang ve ark.,1999).

Liyofilizasyon işlemi için; su içerisinde şişmiş halde bulunan hidrojel kesitleri, 48 saat sonunda sudan çıkarıldı ve  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece boyunca buzdolabında bekletilerek donduruldu. Ardından liyofilizasyon cihazına (FreeZone1, Labconco, Kanada) yerleştirildi. Kesitlerin  $-40^{\circ}\text{C}$ 'de 10 gün boyunca içeriğindeki suyun uzaklaştırılması yoluyla kurutulması sağlandı. Liyofilizasyon işlemi biten numunelerin, taramalı elektron mikroskobunda içyapısını farklı yönlerden gözlemlemek için bir jilet yardımıyla daha küçük boyutlu dikey ve/veya yatay kesitler hazırlandı. Numuneler, kaplama cihazında (Cressington Sputter Coater 108 Auto, Watford, Birleşik Krallık) 3,0 nm ( $\pm 0,5$  nm) kalınlıklı bir altın (Au) tabaka ile kaplandı. Altın kaplanan hidrojel kesitlerinin yüzey topografisi ve mikro yapıları, 15,0 kV altında SEM (VEGA3 SBU-EasyProbe, TESCAN, Çekya) ile görüntülendi.

### **2.5.3. Hidrojel yapısının ışık mikroskobu ile incelenmesi**

KSS'nin morfolojisi, yüzey topografisi ve mikro yapılarının belirlenmesi için taramalı elektron mikroskobu yanında ışık mikroskobuda kullanılmaktadır (Martins ve ark., 2011; Kang ve ark., 1999 ve Imani ve ark., 2013). Etüvde kurutma işlemiyle üretilen hidrojel kesitlerinin yüzey topografisi ve gözenekli yapısını incelemek ve dondurarak kurutulan hidrojel kesitlerinin SEM incelemesinde elde edilen morfolojik bulgular arasında karşılaştırma yapmak, kurutma yönteminin morfoloji üzerindeki muhtemel etkisini araştırmak için etüvde kurutulan, ardından 48 saat süreyle içerisinden distile su bulunan 100 mL hacimli kapaklı numune kaplarında oda sıcaklığında şişmeye bırakılan hidrojel kesitleri alınarak parafin içine gömüldü. Parafin içerisine gömülen hidrojeller kesitleri mikrotom ile kesit elebilmek için kısa süreli  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de donduruldu, sonrasında mikrotom ile kesitler alındı. Lam üzerine alınan kesitler Carl Zeiss Axio Imager D2 mikroskop ve ZEN 3,1 (Blue Edition) görüntüleme sistemi kullanılarak 4-10-20'lik büyütmelemlerle incelendi.

## 2.6. *In vitro* Salım Sisteminde Timol Salım Düzeyinin Ölçülmesi Çalışmaları

Timol etkin maddesi hava konsantrasyonlarının akarlar ve arılar üzerindeki belirlenmiş olan doz-yanıt ilişkisinin (Imdorf ve ark., 2006) gözlemlenebilmesi için, formülasyonların koloniler üzerinde denenmeden önce saha koşullarında kovanlarda maruz kaldıkları salım üzerine etkili olabilecek etmenlere karşı sergiledikleri süblimleşme ve salım kinetiklerinin daha iyi anlaşılabilmesi adına, laboratuvar ortamında saha koşullarının benzer şartlarının oluşturulduğu bir düzeneğe ihtiyaç duyuldu. Bu ihtiyaç üzerine formülasyonların uygulama süreleri boyunca salım üzerine etkili olabilecek literatürden derlenen; kovan içi sıcaklık değişimi 10-35 °C (Çetin, 2004; Meikle ve ark., 2017 ve Toledo ve Nogueire-Couto, 1999), kovan ventilasyonu (Sudarsan ve ark., 2016)  $0,42 \pm 0,01$  L/dk verileri esas alınarak bir düzenek oluşturuldu. Bu düzenek ile sahadaki koloni, kovan ve ilacın maruz kaldığı şartlar normal şartlar ve zor şartlar kolay bir şekilde ayarlanabilmesi planlandı.

Düzenegin teknik tasarımımda, Imdorf ve ark. (1995), Xie ve ark. (2019), çalışmalarından yola çıkıldı. Kovan içi havadan timolün tutulması için kullanılan gaz yıkama şişesi için Aghasi ve ark. (2011), çalışmasından esinlenildi. Online sistem enjeksiyon için Schlitt (1997) modifiye autosampler örneğinden esinlenildi. Oluşturulan bu temel sistemde, akışkan dinamiği ve arı-bal-bal mumu gibi farmakokinetik dağılıma etki edebilecek kompartımanlar ve kovan giriş deliği dışındaki yerlerden oluşabilecek timol kaçakları göz ardı edilerek çalışıldı.

Gaz yıkama şişesinde havadan timolün tutularak sıvı faza geçirilmesi aşamasında; düşük uçuculuk, yüksek çözücülük ve HPLC-DAD sistemindeki timol sistemi ile uyumlu, su ile karışabilen ve timol için çözücülük özelliği yüksek ve asetonitrile göre düşük uçuculuğa sahip 1 metil 2 pirrolidon (NMP) çözücüsü kullanıldı (Sanghvi ve ark., 2008).

Kovan içi havaya gerekleŖen timol salım düzeyinin ölçülmesi için toz haldeki saf timol, referans ilaç ve 1:1 oranında ayçiçek yağında zdrlmŖ timol yüklü glutaraldehit ile çapraz bağlı jelatin hidrojelinin 12,5 g timol içeren numuneleriyle dört haftalık deneyler gerekleŖtirildi.

Deneyin yapılıŖı: Polipropilen kovan içerisine data logger yerleŖtirildi ve terazi üzerine test edilecek ilgili numune konuldu. Ardından kovan kapağı kapatılarak hava sızdırmaması sağlandı. Kovan içerisindeki fan 400 rpm hızında alıŖtırıldı (Xie ve ark., 2019). İlgili hava borusu bağlantıları yapılarak klimatik kabin kapısı kapatıldı. Bilgisayar ve klimatik kabin yazılımı aracığı ile klimatik kabin içi 10  C sıcaklıktan baŖlatılması komutu verildi. OluŖturulan program ile kabin içi sıcaklığın 144 dk da bir 5  C sıcaklık artarak 35  C sıcaklığa kadar çıkması ardından yine 144 dk aralıklarla 5  C sıcaklık azalarak 10  C sıcaklığa kadar inmesi Ŗeklinde 24 saatlik bir döngü komutu timol referans ilacı sağaltım uygulama süresi olan dört hafta boyunca kovana uygulandı.

Polipropilen kovan içerisindeki havada bulunan timol miktarı ölçümü için; hava pompası alıŖtırıldı ve debimetre ile ayarlanarak 0,42 L/dk ( $\pm 0,01$ ) hızda kovandan çekilen havanın, seri bağlı 500 mL hacimlerdeki içerisinde %10'luk NMP zcs bulunan 3 adet gaz yıkama ŖiŖesi içinden geçirilmesi sağlandı. Gaz yıkama ŖiŖelerinden çıkan hava tekrar kovana verilmeden önce fazla miktardaki nemin tutulması için içerisinde silika jel bulunan baŖka bir gaz yıkama ŖiŖeŖinden geçirildi. Kovan içerisindeki nem düzeyi data logger kullanılarak %40 ila %60 bağlı nem limitleri bakımından günlük olarak izlendi. Birinci gaz yıkama ŖiŖesi içerisindeki çözelti tarafından tutulan timolün miktar tayini için HPLC-DAD sistemine sürekli olarak gönderilmesi ve tekrardan gaz yıkama ŖiŖelerine dönmesi poliporpilen kapillar borular ve peristaltik pompa yardımıyla oluŖturulan bir hat ile sağlandı. HPLC-DAD cihazında, timol miktar tayini için geçerli kılınan analitik metot ile 144 dk aralıklarla gaz yıkama ŖiŖesinde tutulan timolün miktar tayini kümülatif olarak yapıldı.

Dört haftalık deney süresi boyunca ikinci ve üçüncü gaz yıkama şişelerinden günlük bir mL numune cam viallere alınarak HPLC-DAD ile analizleri yapılmak üzere 2-8 °C sıcaklığa ayarlı buzdolabında saklandı. Dört haftalık deney süresi sonunda Rushworth ve ark. (2014), % 95/5 hekzan/izopropil alkol çözücüsü ve pamuk swab ile yaptıkları numune alma metodu uygulanarak polipropilen kovan çeperine adsorbe olan timol miktarını belirlemek için numuneler alındı ve HPLC-DAD ile analiz gerçekleştirildi. Dört haftalık deney süresi sonunda HPLC-DAD elde edilen veriler 1 L kovan içi havadaki timol miktarının belirlenmesi için dönüştürüldü ve hidrojel salım kinetiği bu şekilde izlenerek kayıt altına alındı. Kovan içerisine bulunan terazi yardımı ile numunelerin ağırlıkları günlük olarak takip edildi. 1 L kovan içi hava timol konsantrasyonu hesaplamak için; öncelikle gaz yıkama şişelerinden alınarak HPLC-DAD sisteminde ölçülen numune içerisindeki timol konsantrasyonu aşağıdaki eşitlik kullanılarak kümülatif konsantrasyon olarak hesaplandı.

$$\text{Timol kons. } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Numune alanı (mAu)} \times \text{Std. kons. } (\mu\text{g/mL})}{\text{Std. alanı (mAu)}} \times 100$$

Birinci, ikinci ve üçüncü gaz yıkama şişelerinden alınan numunelerin toplam konsantrasyonları hesaplandı. Toz haldeki saf timol, referans ilaç ve 1:1 oranında ayçiçek yağında çözdürülmüş timol yüklü glutaraldehit ile çapraz bağlı jelatin hidrojelinin bu şekilde dört hafta boyunca ölçülen ve hesaplanan konsantrasyonlarıyla, kümülatif konsantrasyon-zaman grafikleri oluşturuldu. Oluşturulan kümülatif konsantrasyon-zaman grafiklerinden eşit miktardaki timol etkin maddesinin salım sistemine göre gerçekleştirdiği salım tipi yorumlandı. Ardından kovan içi havanın bir litresindeki Timol konsantrasyonunun belirlenmesi için aşağıdaki eşitlik kullanıldı. A; toplam numune konsantrasyonu ( $\mu\text{g/mL}$ ), B; çözücü tuzağındaki çözelti hacmi (mL), C; hava örnekleme debisi (L/dk), D; hava örnekleme süresi (dk).

$$\text{Timol konsantrasyonu } (\mu\text{g/L hava}) = \frac{A \times B}{C \times D}$$

Toz haldeki saf timol, referans ilaç ve 1:1 oranında ayçiçek yağında çözdürülmüş Timol yüklü glutaraldehit ile çapraz bağlı jelatin hidrojelinin bu şekilde dört hafta boyunca ölçülen ve hesaplanan bir litre havadaki kümülatif konsantrasyon verileri günler arasındaki konsantrasyon artış farkları hesaplanarak günlük ortalama bir litre kovan içi timol konsantrasyonu olarak dönüştürüldü. Oluşturulan bir litre kovan içi timol konsantrasyonu-zaman grafiklerinden eşit miktardaki timol etkin maddesinin salım sistemine göre gerçekleştirdiği konsantrasyonların, sağaltım penceresi konsantrasyonlarına uyumu bakımından yorumlandı.

## **2.7. *İn vivo* Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Belirleme Çalışmaları**

Bal arısı kolonilerinde yapılacak çalışmalar için Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nda başvurularak gerekli izin (Ek-1) alındı. Araştırmanın yapılacağı bölgenin geçmiş yılların çevre sıcaklıkları ile ilgi veriler değerlendirildiğinde ve koloni akar-arı popülasyon dinamikleri göz önüne alındığında 2021 Yılı Mayıs, Haziran Ayları ve Eylül, Ekim Aylarını içeren iki dönemde İstanbul İli Arı Yetiştiricileri Birliği'ne ait İstanbul Aydos Ormanı içerisinde, 40°55'25.5"K 29°15'04.9"D koordinatlarında bulunan arılıkta gerçekleştirildi.



**Şekil 2.1.** Arılık Bölgesi Genel Görünümü.

*İn vivo* çalışmanın tasarlanmasında ve gerçekleştirilmesinde, EMA tarafından yayımlanan (Anon, 2021a), arılarda *Varroa destructor* enfestasyonu kontrolü amacıyla kullanılan veteriner tıbbi ürünler için etkinlik ve hedef hayvan güvenliğinin araştırmaları hakkındaki rehber doküman temel alındı. Bunun yanında çalışmanın sürdürülebilirliği bakımından literatürde yer alan bilimsel tavsiyeler (Meikle ve ark., 2017) uyarınca çalışmaya başlamadan önce kullanılacak kolonilerin pestisit maruziyetleri ve nosemosis enfestasyonu bakımından mevcut sağlık durumları kontrol edilerek uygun kolonilerin seçimi sağlandı.

**Sağaltımlar Öncesi Koloni Akar Düzeyi ve Sağlık Kontrolleri Araştırmaları:** Kılavuz uyarınca (Anon, 2021a), çalışmanın yürütüleceği arılıktaki bulunan kolonilerde varroosis enfestasyonu mevcut olması gerekmektedir. Bilimsel tavsiyeler (Meikle ve ark., 2017) uyarınca yine kolonilerde pestisit maruziyeti ve nosemosis enfestasyonunda varlığı ve düzeyinin araştırılması önerilmektedir.

*In vivo* çalışma öncesi arılıkta bulunan kolonilerde pudra şekeri metodu (Harris ve ark., 2019 ve Seven Çakmak ve ark., 2017) ile varroosis enfestasyonu, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Toksikoloji Laboratuvarı A.TOK.16 işletme içi metodu ile bal, bal mumu ve arı numunelerinde pestisit varlığı ve düzeyi, Tarım ve Orman Bakanlığı Teşhiş Metot Birliği Kılavuzunda belirtilen noseimosisin mikroskopik teşhiş metodu ile erişkin arılarda noseimosis enfestasyonu bakımından araştırmalar yapıldı. Seçilen tüm koloniler Anadolu ırkı arılardan (*Apis mellifera anatoliaca*) oluşmaktaydı. Çalışmalarda polen çekmeceli Langstroth tipi kovanlar kullanıldı.

Kolonilerde varroosis enfestasyon düzeyinin tespiti; kılavuz uyarınca (Anon, 2021a) çalışmalara dahil edilen kovanlar arasındaki enfestasyon seviyeleri karşılaştırılabilir olmalıdır. Pudra şekeri metodu, farklı şekillerde (Harris ve ark., 2019 ve Seven Çakmak ve ark., 2017) uygulanmasına rağmen, *Varroa* akarlarının arıya tutunmak için kullandığı vantuzları ile arı gövdesi arasındaki bağlantının pudra şekeri partikülleri yardımıyla kesilmesi ve serbestleşen akarların tespiti temeline dayanmaktadır. Metodun en önemli avantajı, numune olarak alınan arıların ölümüne neden olmaması ve arıların tekrar kovana geri verilebilmesidir.

Materyal olarak 1 adet 500 mL hacimli şeffaf cam kavanoz, üzerinde arıların geçemeyeceği ancak pudra şekeri ve akarların geçişine uygun delikler bulunan bir adet kapak, gıda kalitesinde 1,5 kg pudra şekeri, pudra şekeri ölçeği olarak bir adet 100 mL'lik numune kabı, bir adet huni, bir adet plastik kap, arıcı körüğü, arıcı el demiri, arı fırçası ve su kullanıldı. Tütsü yapılarak sakinleştirilen kolonide, el demiri yardımıyla çerçeveler kovandan alınıp sırayla incelenerek üzerinde ana arı olmayan, kuluçka gözlere sahip bir çerçeve tespit edilip kovan dışına alındı. Çerçeve üzerindeki arılar fırça yardımı ile huniye süpürüldü ve kavanoz yaklaşık 300 adet arı ile dolduruldu. Ardından kavanoza içindeki arıları kaplayacak şekilde bir ölçek pudra şekeri konuldu ve kapak kapatılarak kavanoz 3 dk dairesel hareketlerle döndürüldü. Sonrasında kavanoz 3 dk beklemeye bırakıldı. Süre

sonunda kavanoz, plastik kaba silkelenerek pudra şekerinin su ile erimesi ve akarların suyun yüzeyine çıkması sağlandı. Su yüzeyindeki akarlar sayılarak veriler kayıt altına alındı. Ardından kavanozda kalan arılar ait oldukları kovana iade edildi. Her koloni için erişkin arılardan örnekleme ile tespit edilen foretik akar sayısı üzerinden kolonilerdeki toplam foretik akar sayıları ve enfestasyon düzeyinin tahminini gerçekleştirmek için aşağıdaki eşitlik kullanıldı.

$$\text{Enfestasyon Düzeyi (\%)} = \frac{\text{Toplam sayılan akar sayısı}}{\text{Toplam örneklenen arı sayısı}} \times 100$$

Meikle ve ark. (2017), arı kolonilerinde yapılacak çalışmalarda kullanılacak kolonilerin varroosis dışında taşıyabilmesi muhtemel sağlık riskleri bakımından incelenmesinin, çalışmanın sürdürülebilirliği ve elde edilecek verilerin güvenilirliği için önemi vurgulamaktadırlar. Araştırmacılar nosemosis ve pestitit maruziyeti oluşan kolonilerde sürdürülebilirliğin ve hastalıklara karşı direncin düşük düzeyde olduğu bu sebeple de kış mevsimi sırasında ve sonrasında koloni birey sayısının düşmesine neden olduğunu belirtmektedirler. Bu noktadan hareketle çalışmada kullanılacak kolonilerin seçimi için pestisit ve nosemosis enfestasyonu bakımından araştırmalar yapıldı.

Pestisit Maruziyeti Kontrolleri; kolonilerden alınan arı, bal ve bal mumu numunelerinde, ülkemizde yaygın olarak bal arılarının ölümlerine neden olduğu bildirilen (Ünal ve ark., 2010) organik klorlu, organik fosforlu, karbamat ve pretroit grubu pestisitlerin varlığının araştırılması Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Toksikoloji Laboratuvarının, Pestisit Kalıntılarının Sıvı Kromatografi–Kütle/Kütle Spektrometresi (LC-MSMS) ile Analizi (A.TOK.16) metodu ile gerçekleştirildi.

Her koloniden alınan arı, bal ve bal mumu numuneleri 5 g olarak 50 mL’lik santrifüj tüplerine tartıldı. Üzerine 5 mL seyreltme çözeltisi (etil asetat %10+su % 90+asetik asit % 0,1) ilave edildi ve 10 dk boyunca mekanik karıştırıcı ile karıştırılarak homojen hale gelmesi sağlandı. Üzerine 15 mL asetonitril (%1 asetik

asit) çözeltisi eklenerek 2 dk boyunca mekanik karıştırıcı ile karıştırıldı. 1 paket ticari özütleme kiti (QuickClean QuEChERS, emp Biotech) bu tüpe boşaltıldı. Tüp hemen kuvvetlice çalkalandı ve 2 dk boyunca mekanik karıştırıcı ile karıştırıldı. Ardından 1500g`de 1 dk boyunca santrifüj edildi.

Santrifüj sonunda, üst fazdan 8 mL çözelti katı faz özütleme kitine (QuickClean QuEChERS, Dispersive SPE Kit, emp Biotech) alındı ve hemen kuvvetlice çalkalandı ve yine ardından 2 dk boyunca mekanik karıştırıcı ile karıştırıldı. Tüp tekrar 1500g`de 1 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpteki üst fazdan vialle alınarak LC-MSMS sistemine 5 µL enjeksiyon yapıldı.

LC-MSMS sisteminde (Thermo Fisher Scientific Ultimate 3000 series; MS/MS: Thermo Finnigan Discovery Max) mobil faz gradient programla A hattından 5mM amonyum format ve B hattından saf metanol sırasıyla 0-0,5 dk % 98-2, 0,5-2 dk % 60-40, 2-18 dk % 5-95, 18-20 dk % 5-95, 20-22 dk % 5-95, 22-26 dk % 98-2 oranında 0,3 mL/dk akış hızı ile gerçekleştirildi.

100 x 2,1 mm 2,6 µ (THERMO Accucore aQ) ölçülerinde bir kolon yardımıyla kromatografik ayırım sağlandı. Kolon sıcaklığı 30 °C, Dwell Time 0,01, Dedector 1600 V, Needle Voltage 5000 V, Spray Chamber Temperature 50 °C, Drying Gas Temperature 300 °C olarak ayarlandı. Hesaplamalar, Workstation, Xcalibur (Thermo Fisher Scientific) kromatografik programı ile gerçekleştirildi.

**Çizelge 2.2.** *İn vivo* Çalışmalar Öncesi Kolonilerden Alınan ve A.TOK.16 metodu ile Arı, Bal ve Bal Mumu Örneklerinde Taranan Pestisitler.

| Pestisit Adı  | LOQ (µg/kg) | Pestisit Adı   | LOQ (µg/kg) | Pestisit Adı     | LOQ (µg/kg) |
|---------------|-------------|----------------|-------------|------------------|-------------|
| 2.4D          | 10          | Furathiocarb   | 10          | Tolifluanid      | 50          |
| Asetamiprid   | 50          | Hexythiazox    | 50          | Triadimenol      | 50          |
| Alaklor       | 10          | İmidakloprid   | 50          | Triklorfon       | 50          |
| Amitraz       | 20          | İoniksil       | 50          | Trifloksistrobin | 50          |
| Atrazin       | 50          | Lufenuron      | 20          | Triflumizol      | 50          |
| Azoksistrobin | 50          | Malatıyon      | 50          | DMPF             | 20          |
| Bupirimat     | 20          | Metalaksil     | 10          | DMF              | 20          |
| Buprofezin    | 20          | Metolaklor     | 50          | DMA              | 20          |
| Karbaryl      | 50          | Metribuzin     | 50          | Aldikarb         | 50          |
| Karbendazim   | 50          | Monolinuron    | 10          | Propoksür        | 20          |
| Karbofuran    | 10          | Okzadiksil     | 50          | Diazinon         | 20          |
| Klofentezine  | 20          | Oksamil        | 50          | Foksim           | 50          |
| Klorfluazuron | 50          | Okifluorfen    | 50          | Tetraklorvinfos  | 50          |
| Klorpirifos   | 10          | Pendimetalin   | 50          | Sipermetrin      | 50          |
| Siprokonazol  | 50          | Fosalon        | 50          | Fipronil         | 20          |
| Siprodinil    | 50          | Fentoat        | 50          |                  |             |
| Diklofluanid  | 10          | Fosmet         | 50          |                  |             |
| Diklorvos     | 50          | Primikarb      | 50          |                  |             |
| Dimetoat      | 50          | Primifos metil | 50          |                  |             |
| Dimetomorf    | 20          | Profenofos     | 50          |                  |             |
| Epoksikonazol | 50          | Propargit      | 50          |                  |             |
| Etiyon        | 50          | Propikonazol   | 50          |                  |             |
| Etofumesat    | 10          | Propizamit     | 50          |                  |             |
| Famoksadon    | 50          | Pirazofos      | 10          |                  |             |
| Fenarimol     | 50          | Piridaben      | 20          |                  |             |
| Fenazaquin    | 10          | Piriproksifen  | 50          |                  |             |
| Fenoksikarb   | 10          | Simazin        | 50          |                  |             |
| Fenpropatrin  | 50          | Tebukonazole   | 50          |                  |             |
| Fentiyon      | 50          | Terbüttrin     | 50          |                  |             |
| Fludioksonil  | 50          | Tiyametoksam   | 10          |                  |             |

Çalışmada kullanılacak kolonilerin nosemosis enfestasyonu bakımından mikroskopik teşhisi ve enfestasyon düzeyinin tahmini Tarım ve Orman Bakanlığı Teşhiste Metot Birliği Kılavuzu (Anon, 2014b) ve OIE tarafından belirtilen standart metot (Anon, 2013) ile yapıldı.

Materyal olarak kolonilerden alınan 10 adet yaşlı işçi arının abdomeni bir havan için de 5 mL su ile birlikte ezildi. Elde edilen süspansiyon iki katlı gazlı bezden dereceli bir santrifüj tüpüne süzüldü. Havana tekrar 5 mL su eklendi ve

çalkalanarak kalan partiküller farklı bir santrifüj tüpüne iki katlı gazlı bezden geçirilerek süzüldü. Tüpler 800g'de 6 dk santrifüj edildi. Oluşan üst faz uzaklaştırıldı ve tüpler 10 mL seviyesine kadar tekrar suyla dolduruldu. Tek kullanımlık bir pipet yardımıyla çökelti karıştırıldı, sayım yapılacak hemositometre lamı üzerine bu homojenattan kondu. Numuneler dijital kameralı Carl Zeiss Axio Imager D2 mikroskop ve ZEN 3,1 (Blue Edition) görüntüleme sistemi kullanılarak (x400) fotoğraflandı ve *Nosema* spp. spor sayımları yapıldı. Hemositometre lamı üzerinde gözlenen 1 adet *Nosema* spp. sporu, 1 aradaki 10 000 adet spora karşılık geldiği kabul edilerek her koloninin nosemosis düzeyi hesaplandı (Anon, 2014b).

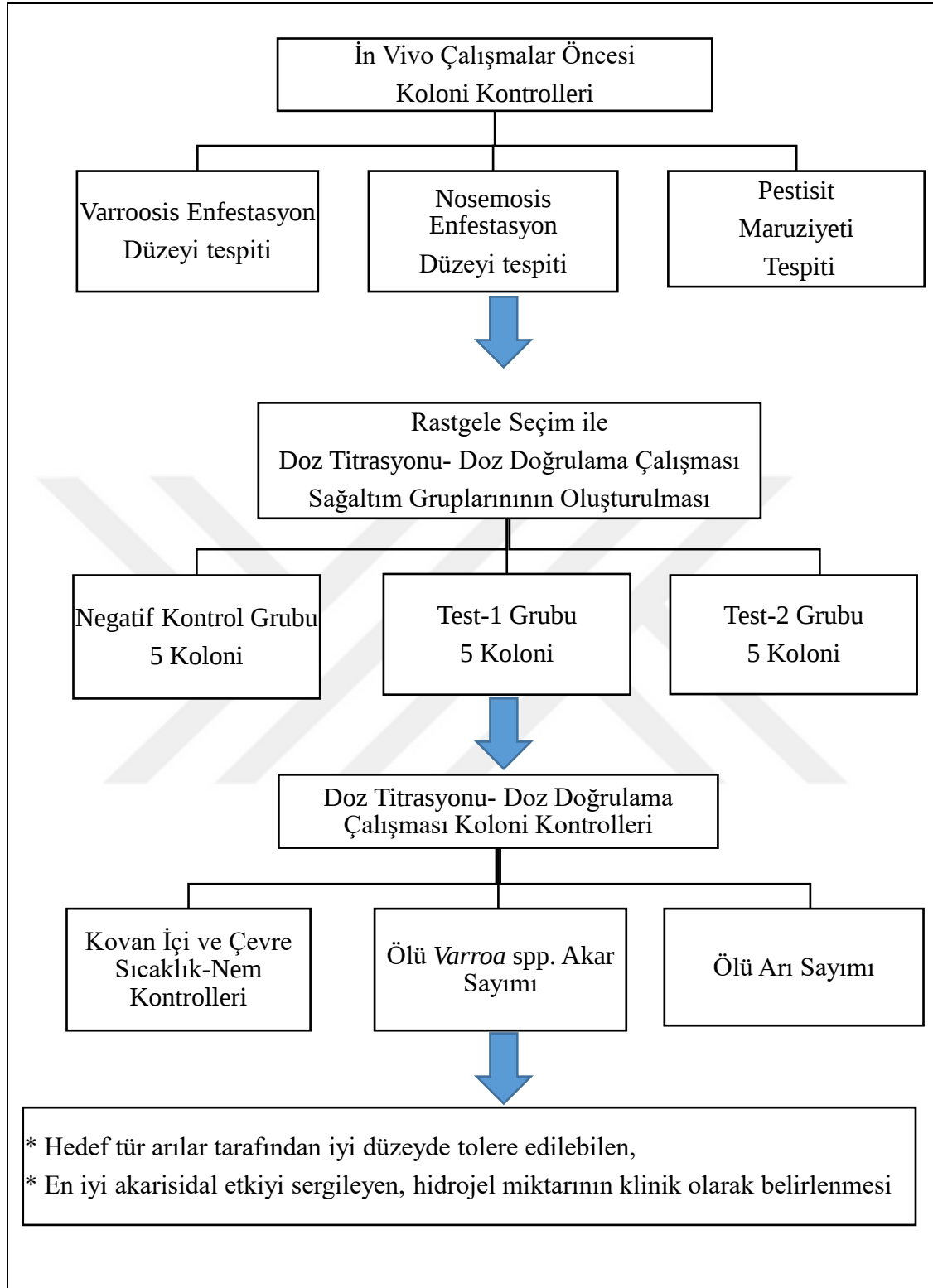
Kılavuz (Anon, 2021a) ayrıca varroosis mücadelesinde kullanılan veteriner tıbbi ürünlerin etkinliğinin, kullanıldığı iklim koşullarına bağlı olacağı, bu sebeple sıcaklık ve yağış ile ilgili koşulların göz önüne alınarak takip edilmesi verilerin kaydedilmesi gerektiği bildirilmektedir. Buradan hareketle çalışma; ilkbahar ve sonbahar gibi yılın farklı çevresel sıcaklık koşullarını sergileyen dönemlerinde araştırmanın amaçları doğrultusunda biri doz titrasyonu-doz doğrulama diğeri referans ilaç ile akarisidal etkinlik, hedef tür tolerans düzeyi ve bal ile bal mumunda timol kalıntısı karşılaştırması olmak üzere iki saha çalışması yapılması planlandı. İki çalışma dönemini kapsayan altı aylık süreçte koloni gelişim özellikleri takip edildi.

Doz titrasyonu ve doz doğrulama çalışmasında; referans ilacın sağaltım süresince uygulanan toplam timol miktarı aşılmamak üzere test hidrojel dozunun araştırılması, sonuçta en iyi akarisidal etkiyi sergileyen ve hedef tür arılar tarafından en iyi düzeyde tolere edilebilen hidrojel miktarının klinik olarak gözlenmesi amaçlandı. Çalışma Öncesi varroosis ve noseiosis enfestasyonu ile pestisit maruziyeti durumları tespit edilen kolonilerden, ana arı yaşı, petek ve ortalama arı sayısı değerlendirilerek birbirine benzer özellikte on beş adet koloni tespit edildi.

On beş koloniden rastgele seçim yöntemiyle, 5 koloni negatif kontrol grubu, 5 koloni test grubu-1 (12,5 g timol içeren jelatin hidrojel x 4 hafta süre ile 1 kez uygulama) 5 koloni test grubu-2 (25 g timol içeren jelatin hidrojel x 4 hafta süre ile 1 kez uygulama) olarak sağaltım grupları oluşturuldu. Sağaltımlar süresince kovan içi ve çevre sıcaklık-nem değerlerinin takibi için arılık bölgesine ve her bir sağaltım grubunu temsilen kovan içlerine bir adet datalogger yerleştirildi. Kovan çerçeveleri üstündeki bölgeye test grubu-1 ve test grubu-2 için hidrojeller konuldu, negatif kontrol gruplarına herhangi bir ilaç uygulaması yapılmadı ve kovan üst kapakları kapatıldı. Kovan polen çekmecelerine yapışkan beyaz kağıtlar yerleştirildi. Kovan önlerine ölü arılar için tuzaklar yerleştirildi. Sağaltım süresi boyunca 3 gün ara ile kovanlardaki arı davranışları, polen çekmecelerindeki yapışkan kağıt üzerindeki ölü akarlar ve kovan önlerine yerleştirilen kapanlardaki ölü arıların sayımları yapıldı. Toplamda dört haftalık akarisidal uygulamalar sonunda tüm hidrojeller kolonilerden alındı. Hidrojeller kolonilerden uzaklaştırıldıktan sonra pudra şekeri testi ile tüm kolonilerdeki akar düzeyi hesaplandı. Akarisidal etkinlik oranları sağaltımlar öncesi ve sonrası koloni akar düzeyleri üzerinden *Henderson-Tilton eşitliği* ile hesaplandı.

Kontrol Grubu Sağaltım Öncesi Akar Sayısı (A), Test Grubu Sağaltım Sonrası Akar Sayısı (B), Kontrol Grubu Sağaltım Sonrası Akar Sayısı (C), Test Grubu Sağaltım Öncesi Akar Sayısı (D).

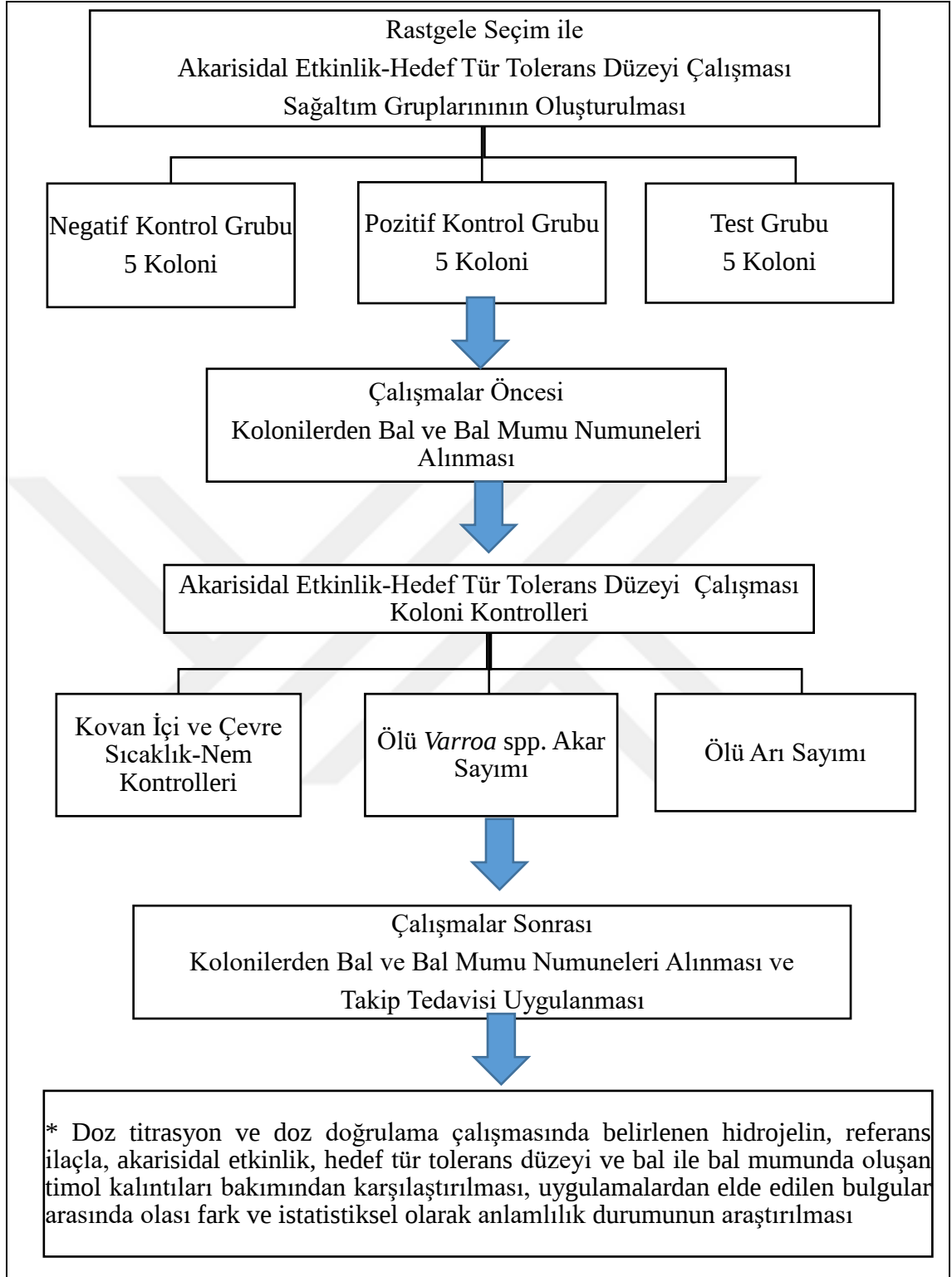
$$\text{Akarisidal Etkinlik (\%)} = 1 - \frac{A \times B}{C \times D} \times 100$$



Şekil 2.2. Doz titrasyonu ve Doz Doğrulama Çalışması Aşamaları Gösterimi.

Akarisidal etkinlik-hedef tür tolerans düzeyi çalışmaları; doz titrasyon ve doz doğrulama çalışmasında en iyi düzeyde akarisidal etkinlik ve hedef tür arılar tarafından iyi düzeyde tolere edilebilen hidrojel miktarı belirlendi. Belirlenen bu hidrojel ile referans timol ilacı arasında akarisidal etkinlik, hedef tür tolerans düzeyi ve bal ile bal mumunda timol kalıntısı bakımından karşılaştırmalı saha çalışması yapıldı. Rastgele seçim yöntemi ile 5 koloni negatif kontrol grubu, 5 koloni pozitif kontrol grubu (12,5 g timol içeren referans ilaç x 2 hafta ara ile 2 kez uygulama) ve 5 koloni test grubu (25 g timol içeren jelatin hidrojel x 4 hafta süre ile 1 kez uygulama) olarak çalışma planı oluşturuldu. Sağaltımlar süresince çevre sıcaklık ve nem değerlerinin takibi için arılık bölgesine, kovan içi değerlerinin takibi için her bir sağaltım grubunu temsilen kovan içlerine birer adet datalogger yerleştirildi. Kovan çerçeveleri üzeri bölgeye negatif kontrol gruplarında herhangi bir ilaç uygulaması yapılmadı, pozitif kontrol grupları için 12,5 g timole eşdeğer referans ilaç ve test grubu için 25 g timol içeren hidrojel konularak kovan üst kapakları kapatıldı. Kovan polen çekmecelerine yapışkan beyaz kağıtlar yerleştirildi. Kovan önlerine ölü arı tuzakları yerleştirildi. Çalışma referans ilaçla sağaltımda önerildiği üzere 4 hafta boyunca sürdürüldü. Sağaltım süresi boyunca 3 gün ara ile kovanlardaki arı davranışları, kovan dip tahtasındaki yapışkan kağıt üzerindeki ölü akarlar ve kovan önlerine yerleştirilen kapanlardaki ölü arıların sayımları yapıldı. Sadece pozitif kontrol grubundaki ilaçlar iki haftanın sonunda kolonilerden alınarak yerlerine yenileri konuldu. Dört haftanın sonunda kolonilerden tüm ilaç uygulamaları uzaklaştırıldı. Kalıntı analizleri için kolonilerden bal ve bal mum örnekleri toplandı. Ardından kolonilere altı hafta süre ile tau-fluvalinate etkin maddesi içeren varroosis mücadele ilacı ile takip tedavisi uygulandı (Cabras ve ark., 1999). Aşağıdaki eşitlik ile akarisidal etkinlik düzeyleri hesaplandı. A; test grubu ile öldürülen akar sayısı, B; takip sağaltımı ile öldürülen akar sayısı.

$$\text{Akarisidal Etkinlik (\%)} = \frac{A}{A \times B} \times 100$$



Şekil 2.3. Akarisidal Etkinlik ve Hedef Tür Tolerans Çalışması Aşamaları Gösterimi.



Şekil 2.4. Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışması Görselleri.

## 2.8. Bal ve Bal Mumunda Timol Kalıntı Düzeylerinin Araştırılması

Çalışma kapsamında timol miktar tayini için geliştirilen sıvı kromatografi analitik metodunun bal, bal mumu matrislerinde geri kazanım çalışmaları yapılarak kalıntı analizlerinde metodun kullanımı için doğrulanması sağlandı. *In vivo* çalışma öncesi ve sağaltımlar sonrası kolonilerden bal ve bal mumu örnekleri toplandı ve etiketlenerek analizleri gerçekleştirilinceye kadar – 20 °C sıcaklıkta saklandı.

Numunelerin özütlenmesi ve analizi için aşağıda belirtilen metotlar uygulandı. Bal için kör numune, kalibrasyon numunesi ve test numunelerin hazırlanması: Literatürde yer alan metotlardan (Bogdanov ve ark., 1998; Martel ve Zeggane, 2002) hareketle ve bazı değişiklikler yapılarak çalışma gerçekleştirildi. Tüm numuneler için 2,5 g bal 50 mL'lik polipropilen santrifüj tüplerine tartıldı ve üzerlerine 7 mL distile su eklendi. Ardından kör numune, kalibrasyon numuneleri ve test numuneleri için asetonitrilde hazırlanan 10 µg/mL p-cumenol konsantrasyonlu internal standart çözeltisinden 1 mL eklendi. 0,25; 0,5; 1 µg/mL kalibrasyon numuneleri için asetonitrilde hazırlanan 10 µg/mL timol konsantrasyonlu çözeltisinden sırası ile 0,25; 0,5; 1 mL kalibrasyon numunesi tüplerine eklendi. Tüm numunelerin 1000 rpm hıza ayarlı mekanik karıştırıcıda 20 dk süre ile homojen çözelti haline gelmesi sağlandı. 6 mL metanol ve 6 mL su ile aktive edilen SPE kartuştan (SiliaPrep™, SPE-R00230B-03P) numuneler geçirildi. SPE kartuşlar ardından 6 mL su ile tekrar yıkandı ve son olarak 1 mL metanol ile kartuşlarda tutunan timol ve p-cumenolün 10 mL hacimli balon jojelere aktarılması sağlandı. Balon jojeler %80 asetonitril çözeltisi ile 10 mL hacme tamamlandı. Elde edilen çözelti 0,45 µm PTFE filtreden geçirilerek cam viallere alındı ve HPLC-DAD ile analiz edildi.

Bal mumu için kör numune, kalibrasyon numunesi ve test numunelerin hazırlanması: Özütleme İçin Jamal ve ark. (2020), metodundan hareketle ve bazı

değişiklikler yapılarak çalışma gerçekleştirildi. Tüm numuneler için 2,5 g bal mumu 50 mL'lik polipropilen santrifüj tüplerine tartıldı ve her bir tüpe 10 mL n hekzan çözücüsü eklendi. Ardından kör numune, kalibrasyon numuneleri ve test numuneleri için asetonitrilde hazırlanan 10 µg/mL p-cumenol konsantrasyonlu internal standart çözeltisinden 1 mL eklendi. 0,25; 0,5; 1 µg/mL kalibrasyon numuneleri için asetonitrilde hazırlanan 10 µg/mL timol konsantrasyonlu çözeltisinden sırası ile 0,25; 0,5; 1 mL kalibrasyon numunesi tüplerine eklendi. 1000 rpm hıza ayarlı mekanik karıştırıcıda 20 dk süre ile homojen çözelti haline gelmesi sağlandı. Ardından – 10 °C 4000 devir 20 dk süre ile santrifüj edildi. Oluşan üst faz 0,45 µm PTFE filtreden süzülerek farklı bir santrifüj tüpüne alındı. Elde edilen süzüntü – 10 °C 4000 devir 20 dk süre ile santrifüj edildi. Oluşan üst faz 0,45 µm PTFE filtreden süzülerek 10 mL'lik balon jojelere aktarıldı. Balon jojeler %80 asetonitril çözeltisi ile 10 mL hacme tamamlandı. Elde edilen çözelti 0,45 µm PTFE filtreden geçirilerek cam viallere alındı ve HPLC-DAD ile analiz edildi.

## **2.9. Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Değerlendirme Metodu**

Sağaltım gruplarından elde edilen verilerinin istatistiksel değerlendirmesinde; öncelikle tüm grupların verileri normal dağılım gösterip göstermediğinin belirlenmesi için Kolmogorov-Smirnov normal dağılım testi gerçekleştirildi. Verilerin ikiden fazla bağımsız gruptan elde edilmesi ve normal dağılım göstermesi durumunda, olası istatistiksel farklılığın araştırılması için Tek Yönlü Varyans Testi (One way ANOVA) kullanıldı. Varyans analizi sonrası Tukey HSD yöntemi ile gruplar kendi aralarında karşılaştırılarak istatistiksel farklılık oluşturan gruplar belirlendi. Çalışmada, sağaltım grupları arasında hedef tür tolerans düzeyleri, bal ve bal mumu timol kalıntı düzeyleri, akarısidal etkinlik düzeyleri % 95 güven düzeyinde (% 5 hata payı iki uçlu ( $\alpha = 0,05$ )) (Anon, 2021b ve Sönmez, 2010) SPSS (Statistics, 26 version) kullanılarak istatistiksel olarak yorumlandı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Timol Tayin Metodu Geçerli Kılma Çalışması Bulguları

Seçicilik (spesifity) çalışması kapsamında timol alıkonma zamanında herhangi bir girişim gözlenmedi.

Kesinlik/Tekrarlanabilirlik parametresi kapsamında yapılan, sistem tekrarlanabilirliği çalışması sonucu RSD %0,11 olarak, metot tekrarlanabilirliği çalışması sonucu RSD %1,66 olarak, laboratuvar içi üretilebilirlik çalışması sonucu RSD %1,74 olarak hesaplandı.

Kalibrasyon eğrisi verilerinin regresyonu ile yapılan hesaplamada teorik olarak Tespit Limiti (LOD) 0,0062261 µg/mL ve Hesaplama Limiti (LOQ) 0,018866 µg/mL olarak hesaplandı. LOQ doğrulama çalışmasında %RSD 1,64 olarak hesaplandı.

Doğrusallık çalışmasında; 0,25-15 ug/mL konsantrasyon aralığında korelasyon katsayısı 0,9999 olarak hesaplandı.

Aralık (Sınırlar/Range) çalışmasında; 10µg/mL kontrol konsantrasyonu (%100) için %80-%120 konsantrasyonları aralığında %RSD değeri 0,89 olarak hesaplandı.

Doğruluk parametresi; çalışmalar sonucu hidrojel için %100,3, *in vitro* salım hava numunesi için %99,9 olarak, bal numuneleri için %99,93 ve bal mumu numunesi için %100,6 olarak hesaplandı.

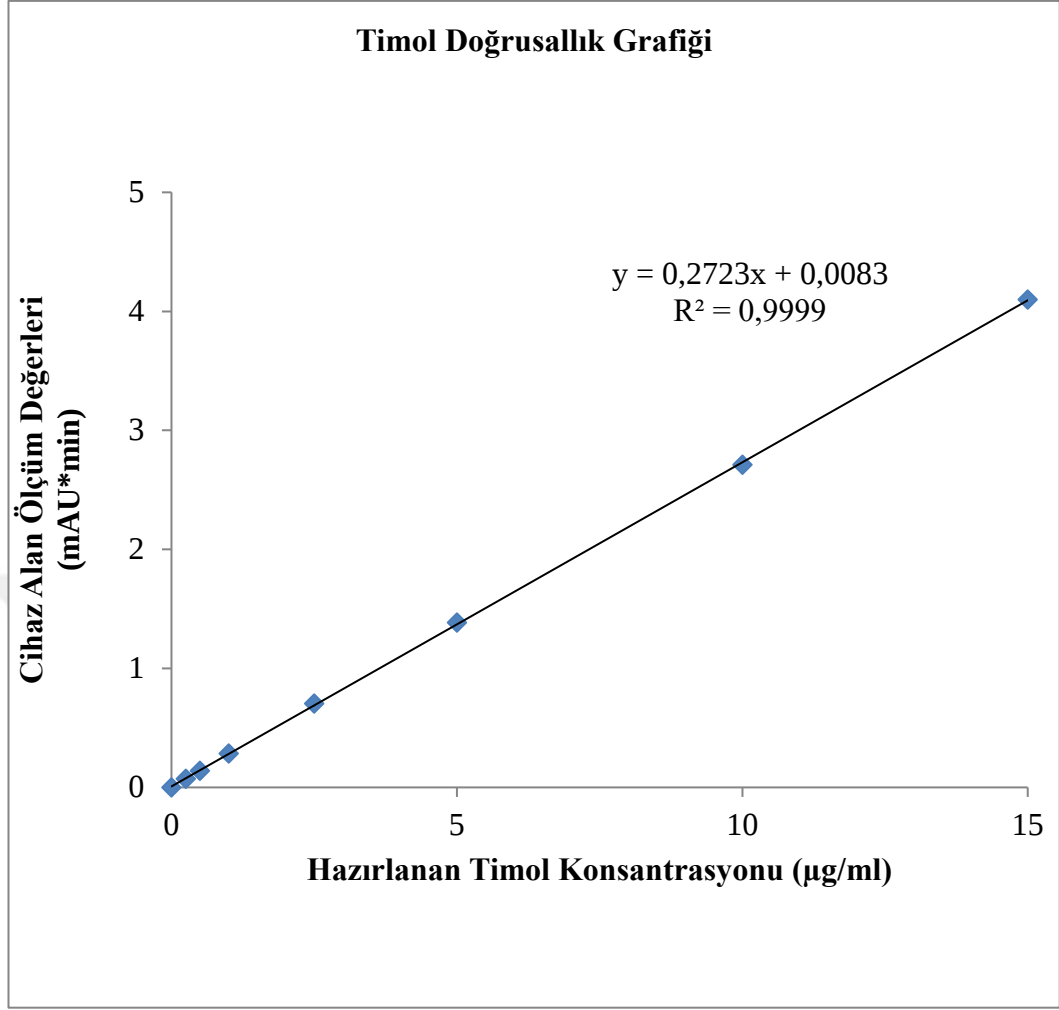
Sağlamlık çalışmasında; normal şartlarda elde edilen alanlar ile değişiklikler yapılarak elde edilen alanlar arası fark %0,101 olarak hesaplandı.

Çözelti stabilitesi çalışmasında, oda koşullarında ve buzdolabı koşullarında muhafaza edilen 10 µg/ml konsantrasyonuna sahip timol içeren çözeltilerinin HPLC-DAD ile başlangıç ve periyodik aralıklarla gerçekleştirilen ölçümler gerçekleştirildi. İlk enjeksiyon alan değeri ile en son elde edilen alanlar arası karşılaştırmada; timol standart çözeltisinin oda koşulunda 42'inci saatte yapılan ölçümünde %1,26 düzeyinde fark olduğu, buzdolabı koşulunda 90'inci günde yapılan ölçümde %1,67 düzeyinde fark olduğu bu zaman noktalarından sonra yapılan ölçümlerde farkın % 2'yi aştığı belirlendi.

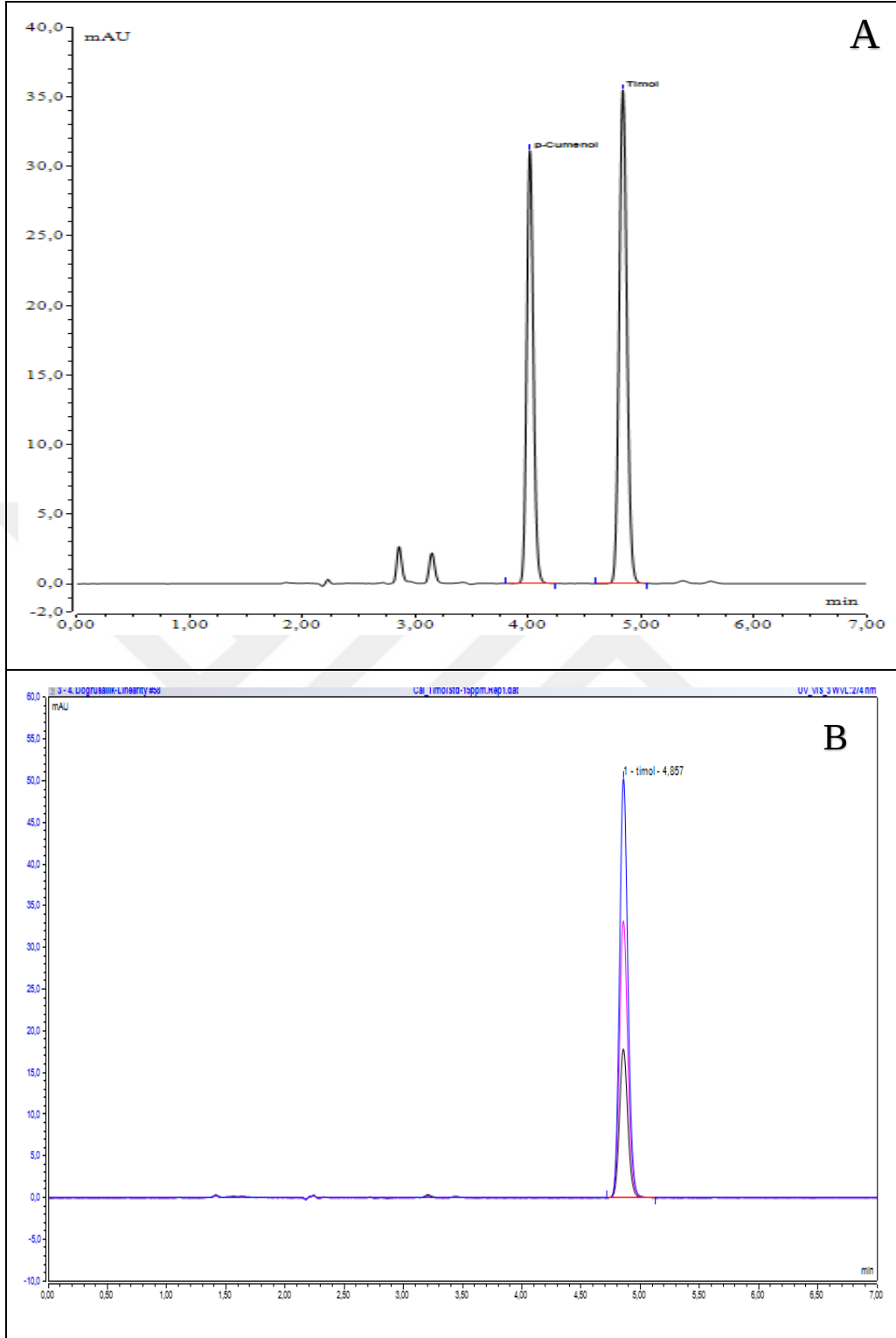
Hidrojel numunesinin oda koşulunda 48'inci saatte yapılan ölçümünde %1,92 düzeyinde fark olduğu, buzdolabı koşulunda 90'inci günde yapılan ölçümde %1,87 düzeyinde fark olduğu bu zaman noktalarından sonra yapılan ölçümlerde farkın % 2'yi aştığı belirlendi.

Timol *in vitro* salım numunesinin oda koşulunda 4'üncü hafta sonunda yapılan ölçümünde oluşan farkın % 1,89 düzeyinde olduğu, bu zaman noktalarından sonra yapılan ölçümlerde farkın % 2'yi aştığı belirlendi.

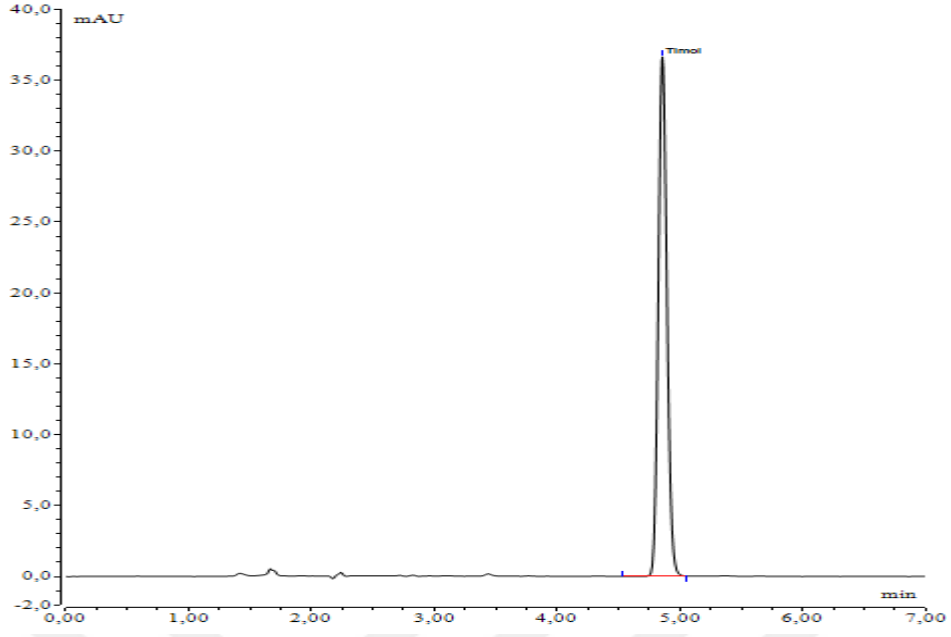
Sonuçlar kapsamında ilgili çözeltilerin stabilite süreleri belirlendi. Tüm parametrelerin değerlendirilmesi sonucu analitik metodun geçerli olduğu tespit edildi.



**Şekil 3.1.** Timol Doğrusallık Grafiği (0-0,25-0,5-1-5-10-15-20 µg/mL).

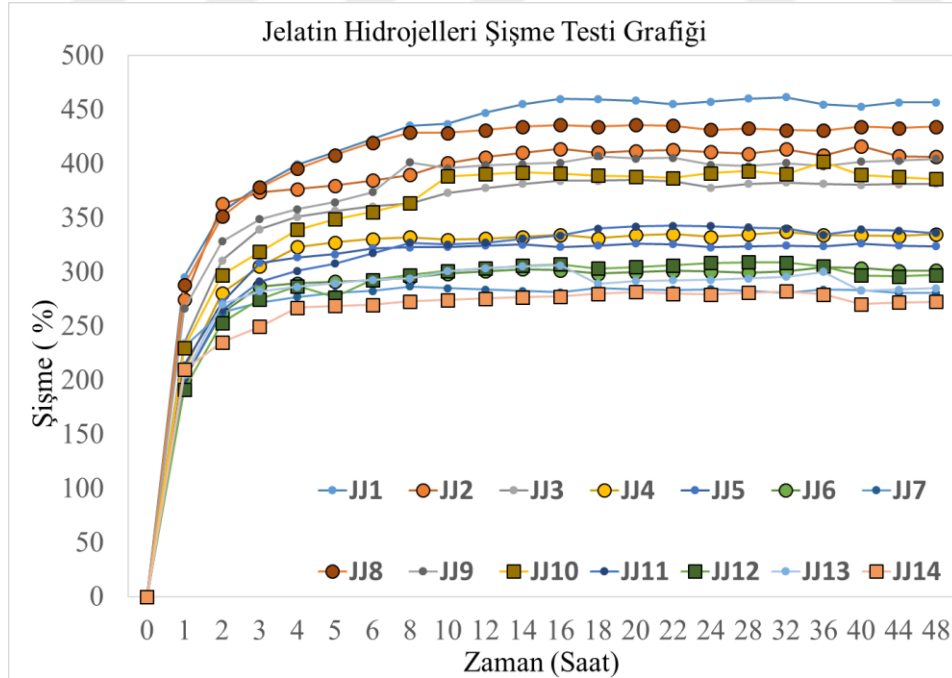


**Şekil 3.2.** A- Timol ve p-cumenol (10 µg/mL), B- Timol (5-10-15 µg/mL) HPLC-DAD kromatogramları.



Şekil 3.3. Hidrojel Numunesi HPLC-DAD Kromatogramı (10 µg/mL).

### 3.2. Hidrojellerin Şişme Testi Bulguları



Şekil 3.4. Jelatin Hidrojelleri Şişme Testi Grafiği.

**Çizelge 3.1.** Jelatin Hidrojelleri % Şişme-Yapı Görünümü- Sağlamlık Değerlendirmesi.

| Jelatin Hidrojel Kodu | % şişme | Yapı Görünümü-Sağlamlık             |
|-----------------------|---------|-------------------------------------|
| JJ1                   | 457     | Gevşek yapıda                       |
| JJ2                   | 406     | Düzgün şekilli, hafif gevşek yapıda |
| JJ3                   | 381     | Düzgün şekilli, sağlam yapılı       |
| JJ4                   | 335     | Düzgün şekilli, sağlam yapılı       |
| JJ5                   | 324     | Düzgün şekilli, hafif gevşek yapıda |
| JJ6                   | 301     | Gevşek yapıda                       |
| JJ7                   | 281     | Gevşek yapıda                       |
| JJ8                   | 434     | Gevşek yapıda                       |
| JJ9                   | 404     | Düzgün şekilli, hafif gevşek yapıda |
| JJ10                  | 386     | Düzgün şekilli, sağlam yapılı       |
| JJ11                  | 336     | Düzgün şekilli, sağlam yapılı       |
| JJ12                  | 297     | Düzgün şekilli, hafif gevşek yapıda |
| JJ13                  | 285     | Hafif gevşek yapıda                 |
| JJ14                  | 272     | Hafif gevşek yapıda                 |

Tüm jelatin hidrojelleri 48 saatlik şişme testini dağılma sergilemeden tamamladı. % şişme değerleri ve yapı görünümü-sağlamlık açısında yapılan değerlendirmede, jelatin ve glutaraldehit çapraz bağlayıcısı ile oluşturulan JJ3 ve JJ10 kodlu hidrojeller ile timol yüklenebilme çalışmasına geçilmesine karar verildi.

$\text{FeCl}_3$  çapraz bağlayıcısı ile üretilen Na-Aljinat hidrojelleri 48 saatlik şişme testini dağılma sergilemeden tamamladı.  $\text{CaCl}_2$  çapraz bağlayıcısı ile üretilen Na-Aljinat hidrojelleri 48 saatlik şişme testini dağılma sergilemeden tamamladı.  $\text{FeCl}_3$  ile çapraz bağlanan hidrojellerde ortalama şişme %150 düzeyinde gözlemlendi. Aynı durum  $\text{CaCl}_2$  ile çapraz bağlanan hidrojellerde de gözlemlendi.

$\text{FeCl}_3$  çapraz bağlayıcısı ile üretilen CMC hidrojelleri 48 saatlik şişme testini dağılma sergilemeden tamamladı.  $\text{CaCl}_2$  çapraz bağlayıcısı ile üretilen Na-Aljinat hidrojelleri 48 saatlik şişme testini dağılma sergilemeden tamamlayamadı.  $\text{FeCl}_3$  ile çapraz bağlanan hidrojellerde ortalama şişme %150 düzeyinde gözlemlendi.

Bulgular Na-Aljinat ve CMC polimerleri ile denenen hidrojellerin, KSS geliştirme için gereken farklı özelliklere sahip yeterli sayıda alternatif hidrojel oluşturulamadığını göstermektedir. Bu durum ve yapı görünümü-sağlamlık bakımından homojen diskler elde edilememesi nedeni Na-Aljinat ve CMC hidrojellerine timol yüklenebilme çalışmalarında yer verilmedi.

### 3.3. Hidrojellerin Timol Yüklenebilme Testi Bulguları

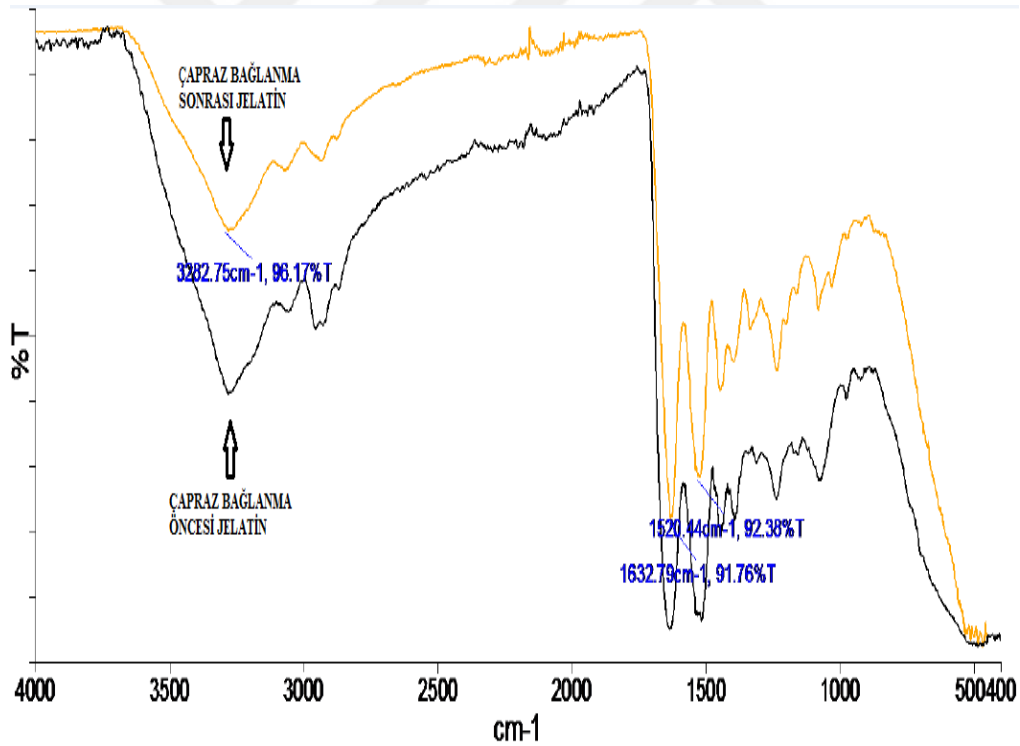
**Çizelge 3.2.** Jelatin Hidrojeli % Timol Yüklenebilme Düzeyi -Yapı Görünümü-Sağlamlık Değerlendirmesi.

| Jel Kodu | Yapı Görünümü- Sağlamlık                                    | Yük. Düzeyi (%) |
|----------|-------------------------------------------------------------|-----------------|
| JJ1      | Sert, bozuk şekilli, dış yüzeyde timol partikülleri var     | 22,91           |
| JJ2      | Yumuşak, düzgün şekilli, dış yüzeyde timol partikülleri var | 26,95           |
| JJ3      | Sert, bozuk şekilli, dış yüzeyde timol partikülleri yok     | 20,07           |
| JJ4      | Sert, bozuk şekilli, dış yüzeyi yağlı                       | 20,13           |
| JJ5      | Sert, düzgün şekilli, dış yüzeyi yağlı                      | 27,49           |
| JJ6      | Yumuşak, düzgün şekilli, dış yüzeyi yağlı                   | 25,68           |
| JJ7      | Sert, bozuk şekilli, dış yüzeyde timol partikülleri var     | 27,01           |
| JJ8      | Sert, bozuk şekilli, dış yüzeyde timol partikülleri var     | 24,72           |
| JJ9      | Sert, bozuk şekilli, dış yüzeyde timol partikülleri var     | 29,80           |
| JJ10     | Sert, düzgün şekilli, dış yüzeyi yağlı                      | 28,58           |
| JJ11     | Sert, düzgün şekilli, dış yüzeyi yağlı                      | 24,40           |
| JJ12     | Sert, düzgün şekilli, dış yüzeyi yağlı                      | 25,41           |

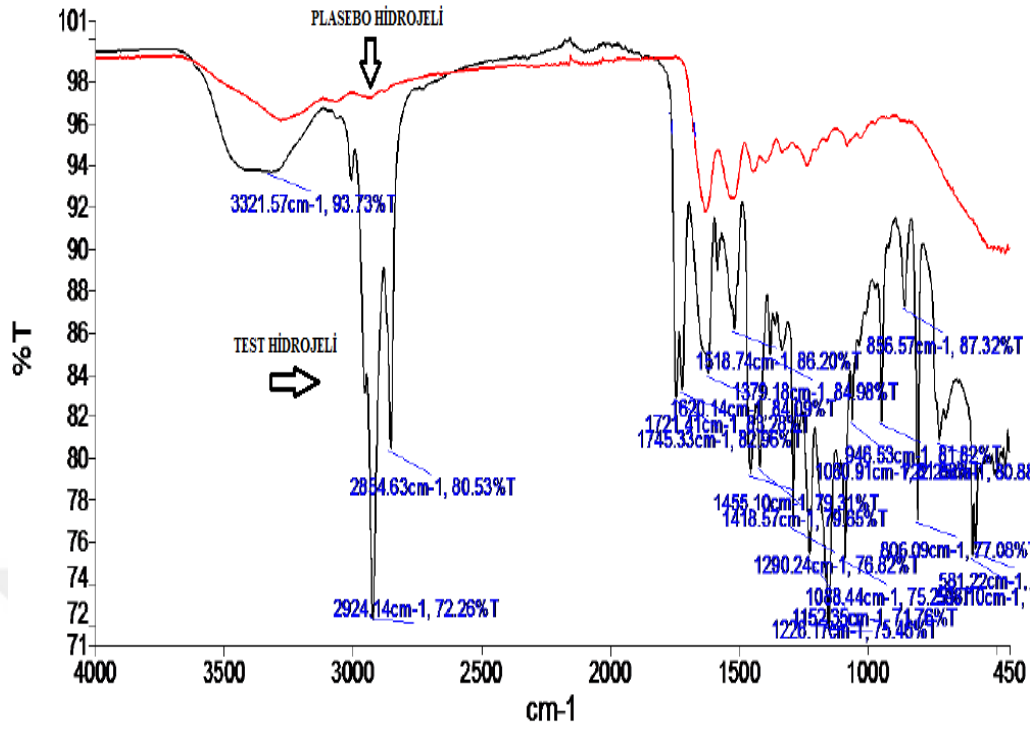
Yükleme yapılan hidrojeller; yapı görünümü - sağlamlık, yükleme verimi özellikleri bakımından değerlendirdi. Tüm değerlendirmeler sonucu JJ10 kodlu jelatin polimeri, glutaraldehit çapraz bağlayıcısı, timol etkin maddesi ve ayçiçek yağı içeren hidrojel ile *in vitro* salım denemelerine geçilmesine karar verildi.

### 3.4. Hidrojellerin Karakterizasyonu ve Hidrojel Morfolojisi İnceleme Bulguları

Çapraz bağlanmamış jelatinin FT-IR spektrumunda  $3283\text{ cm}^{-1}$ 'de geniş bir pik vardır ve bu pik jelatin yapısındaki birincil amin grubu (N-H) pikidir. Çapraz bağlanmamış jelatinin ve çapraz bağlı jelatinin bu bölgedeki pikleri incelendiğinde (Şekil 3.5.), çapraz bağlanma reaksiyonu sonrası jelatinin birincil amin içeriğinin belirgin şekilde azaldığı görüldü. Bu durum jelatinin amino grupları ile glutaraldehitin aldehit grupları arasındaki kimyasal reaksiyon sonucu çapraz bağlanmanın şekillendiğini göstermektedir. Test hidrojel FT-IR spektrumlarına göre (Şekil 3.6.),  $2924\text{ cm}^{-1}$  ve  $2854\text{ cm}^{-1}$ 'de timolün karakteristik C-H bağı pikleri tespit edildi.

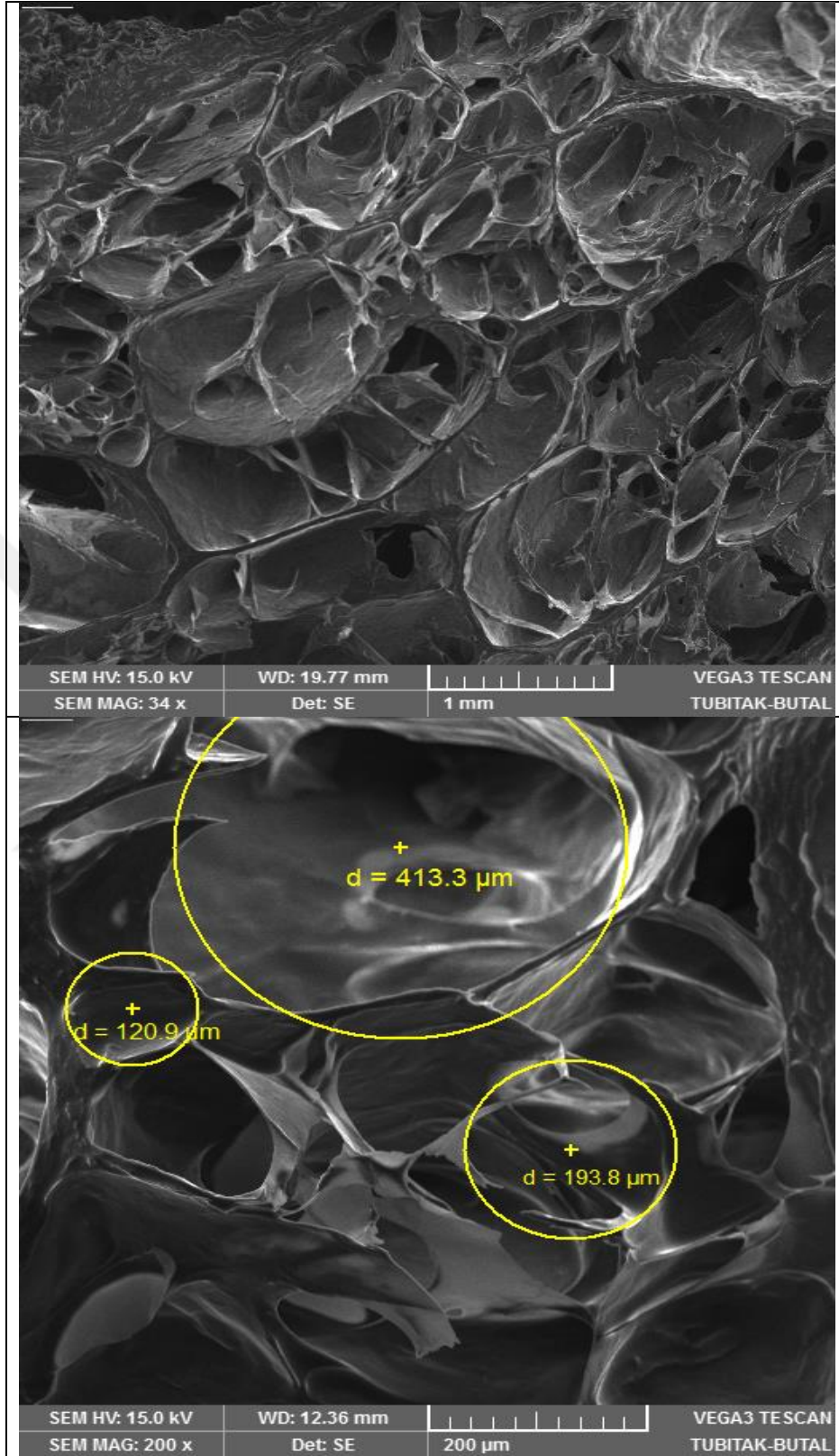


Şekil 3.5. Çapraz Bağlanma Öncesi ve Sonrası Jelatinin FT-IR Spektrumları Karşılaştırması.

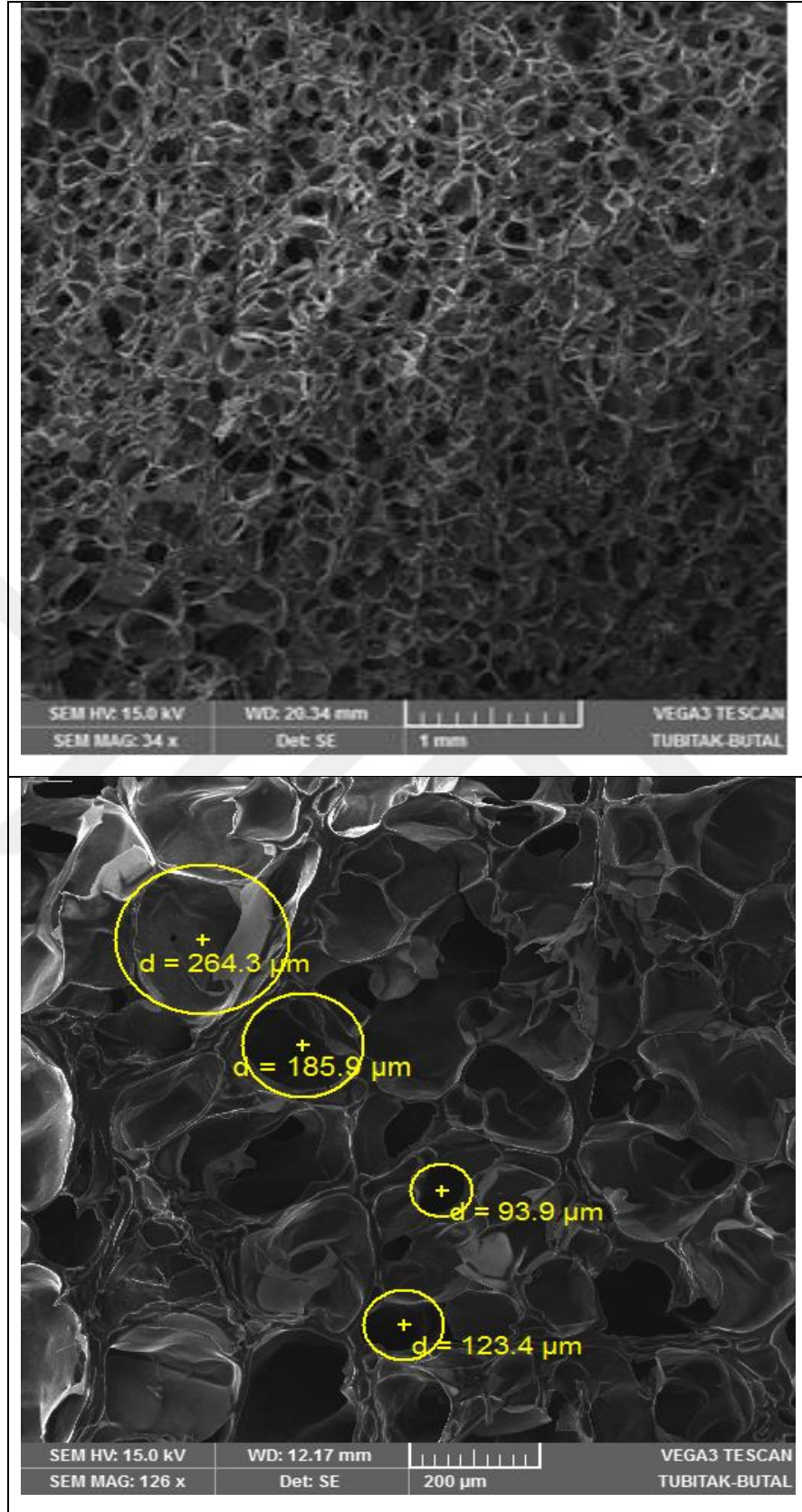


Şekil 3.6. Plasebo ve Test hidrojellerinin FT-IR Spektrumları Karşılaştırması.

Dondurularak kurutulan hidrojeller baskı uygulandığında parçalanmaya müsait bir yapı sergiledi. Hidrojel mikroyapısı içerisinde yer alan mikro düzeydeki gözeneklerin taramalı elektron mikroskobu (VEGA3 SBU-EasyProbe, TESCAN, Çekya) görüntülerinde ölçülen çapları plasebo hidrojel için 120,9-413 µm, test hidrojel için 93,9-264,3 µm olarak belirlendi.

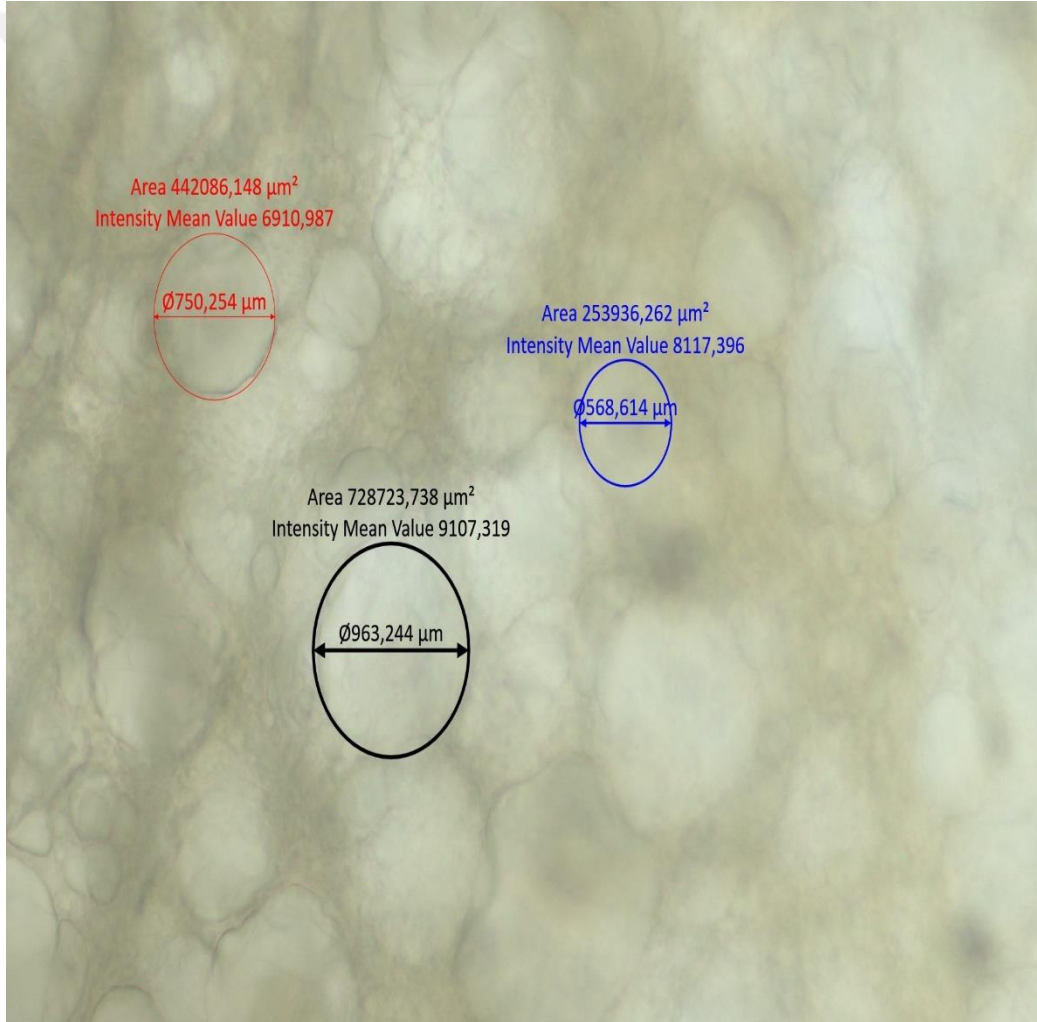


Şekil 3.7. Plasebo Hidrojeli SEM Görüntüleri.

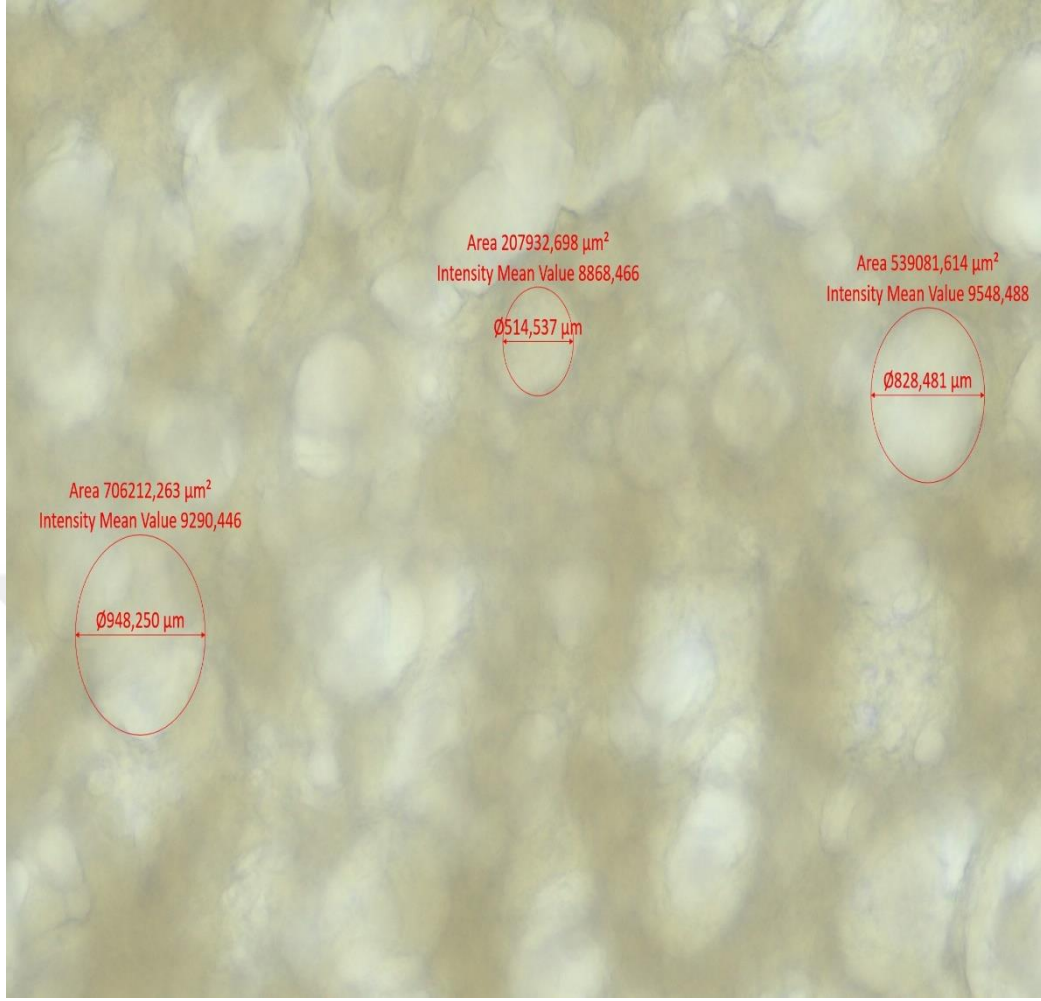


Şekil 3.8. Test Hidrojeli SEM Görüntüleri.

Liyofilizasyon işleminin ve etüvde kurutmanın yüzey topografisi ve gözenekli yapıya olan muhtemel etkilerini karşılaştırmak için, etüvde kurutulan plasebo ve test hidrojelleri parafin içine gömüldü ve  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta dondurulduktan sonra mikrotom ile kesitler alındı. Kesitler lam üzerine alınarak doğrudan dijital kameralı Carl Zeiss Axio Imager D2 ışık mikroskobu ve ZEN 3.1 (Blue Edition) görüntüleme sistemi kullanılarak (x20) fotoğraflandı. Yapılan ölçümlerde plasebo ve test hidrojeli için en küçük ve en büyük gözenek çapları sırasıyla  $568\text{-}963\text{ }\mu\text{m}$  olarak belirlendi.



**Şekil 3.9.** Plasebo ve Test Hidrojeli Işık Mikroskobu Görüntüsü (x20 büyütme).



**Şekil 3.10.** Plasebo ve Test Hidrojeli Işık Mikroskobu Görüntüsü (x20 büyütme).

### 3.5. Hidrojellerin Farmasötik Kalite ve Stabilité Özellikleri Bulguları

Avrupa Farmakopesi (E.P.) 2.9.5. hacim/kütle tekdüzeliği monografi (Anon, 2021d)'na göre 20 hidrojel hassas terazi (AK160, Mettler Toledo, Ohio, ABD) ile tartıldı. Tartımlardan en fazla ikisi ortalamadan %10 sapma gösterebilir ve hiçbir tartım %20'den fazla sapma göstermemelidir. Yapılan tartımlarda sonuçların E.P. 2.9.5. hacim/kütle tekdüzeliği testini karşıladığı tespit edildi.

**Çizelge 3.3.** Hidrojellerin Hacim/Kütle Tek Düzeliği Testi Bulguları.

| Hidrojel | Ağırlık (g)   |
|----------|---------------|
| 1        | 54,22         |
| 2        | 54,14         |
| 3        | 52,78         |
| 4        | 57,69         |
| 5        | 49,96         |
| 6        | 49,98         |
| 7        | 52,82         |
| 8        | 55,25         |
| 9        | 48,86         |
| 10       | 50,34         |
| 11       | 53,58         |
| 12       | 58,84         |
| 13       | 59,55         |
| 14       | 57,85         |
| 15       | 59,60         |
| 16       | 52,88         |
| 17       | 54,83         |
| 18       | 54,10         |
| 19       | 52,68         |
| 20       | 53,48         |
| Ortalama | 54,17         |
| %90-%110 | 48,75 - 59,58 |
| %80-%120 | 43,33 - 65,00 |

E.P. 2.9.6 içerik tek düzeliği monografi (Anon, 2021e) C metoduna göre 10 dozaj biriminin ortalama içeriği, belirtilen içeriğin %90'ı ile %110'u arasındaysa ve her bir dozaj birimi için içerik, ortalamanın %75'i ile %125'i arasındaysa sonuçlar uygundur. Yapılan HPLC-DAD ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde E.P. 2.9.6 içerik tek düzeliği testini karşıladığı tespit edildi.

**Çizelge 3.4.** Hidrojellerin İçerik Tek Düzeliği Testi Bulguları.

| Hidrojel                                | Ölçülen timol içeriği (g) |
|-----------------------------------------|---------------------------|
| 1                                       | 12,46                     |
| 2                                       | 11,76                     |
| 3                                       | 11,04                     |
| 4                                       | 12,49                     |
| 5                                       | 12,10                     |
| 6                                       | 11,14                     |
| 7                                       | 11,61                     |
| 8                                       | 11,77                     |
| 9                                       | 11,44                     |
| 10                                      | 11,78                     |
| Ortalama                                | 11,76                     |
| Belirtilen İçeriğin (12,5 g) %90-%110'u | 11,25 – 13,75             |
| Ortalama İçeriğin (11,76g) %75-%125'i   | 8,82 – 14,70              |

**Çizelge 3.5.** Hidrojellerin Stabilite Kontrol Testi Bulguları.

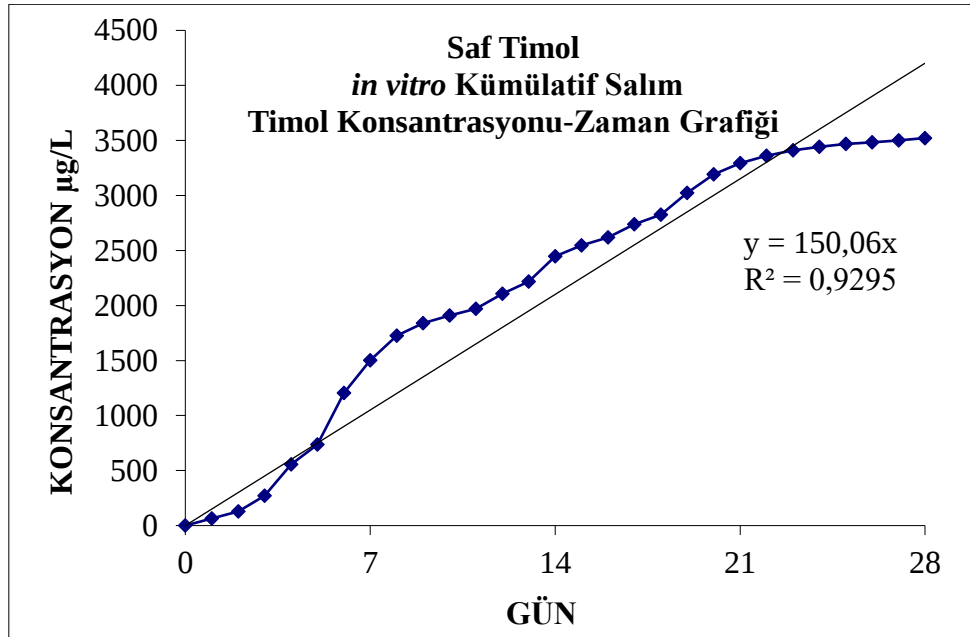
| Spesifikasyon   |            | Ağırlık (g)                                                   | Etkin Madde Miktarı (g)                                              |
|-----------------|------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Limitler        |            | Ort. 54,17 g/hidrojel<br>(%90-%110= 48,75 - 59,58 g/hidrojel) | Ort. 11,76 g timol/hidrojel<br>(% 90-%110= 10,58 - 12,93 g/hidrojel) |
| Referans/ Metot |            | 2.9.5 hacim/kütle<br>tekdüzeliği (E.P. 10.0)                  | 2.9.6 içerik tek düzeliği<br>(E.P. 10.0)                             |
| Cihaz           |            | Hassas Terazı                                                 | HPLC-DAD                                                             |
| Sonuçlar        |            |                                                               |                                                                      |
| Başlangıç       | Hidrojel 1 | 55,61                                                         | 12,49                                                                |
|                 | Hidrojel 2 | 51,08                                                         | 12,10                                                                |
|                 | Hidrojel 3 | 48,98                                                         | 11,14                                                                |
| 3. Ay           | Hidrojel 1 | 51,76                                                         | 11,61                                                                |
|                 | Hidrojel 2 | 55,1                                                          | 11,77                                                                |
|                 | Hidrojel 3 | 54,35                                                         | 11,44                                                                |
| 6. Ay           | Hidrojel 1 | 54,26                                                         | 11,46                                                                |
|                 | Hidrojel 2 | 52,10                                                         | 11,16                                                                |
|                 | Hidrojel 3 | 50,35                                                         | 11,04                                                                |

Hidrojellerin başlangıç, üçüncü ve altıncı ayda yapılan 2.9.5 hacim/kütle tekdüzeliği (Anon, 2021d) ve 2.9.6 içerik tek düzeliği (Anon, 2021e) analizleri sonucu altı aylık süreç içerisinde farmasötik kalite özellikleri açısından stabilitesini koruduğu belirlendi.

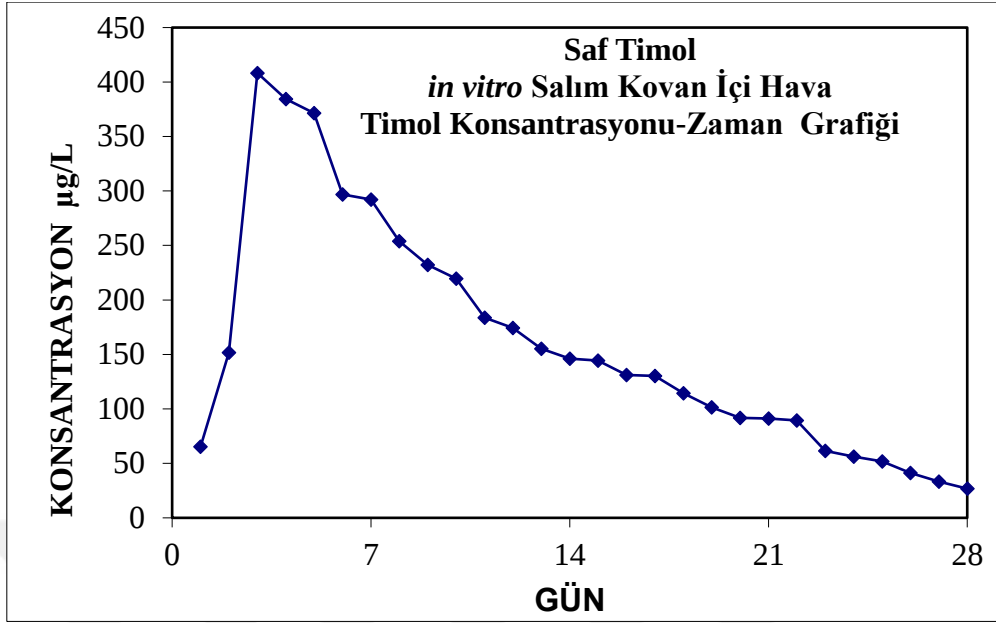
### 3.6. *İn vitro* Salım Sisteminde Timol Salım Düzeyi Ölçüm Çalışması Bulguları

Gravimetrik ölçümlerde; 12,5 g saf timolden 4 hafta sonunda 5,28 g süblimleşme gerçekleştiği tespit edildi.

HPLC-DAD ile yapılan ölçümlerde süblimleşen timolün, yaklaşık %57 sinin (3,03 g) kovan çeperine adsorbe olduğu, %43'ünün (2,25 g) çözücü tuzaklarında tutulduğu tespit edildi. Saf timolün *in vitro* kümülatif salım konsantrasyon-salım grafiği incelendiğinde dört haftalık süre içerisinde birinci derece salım tipi sergilediği belirlendi.



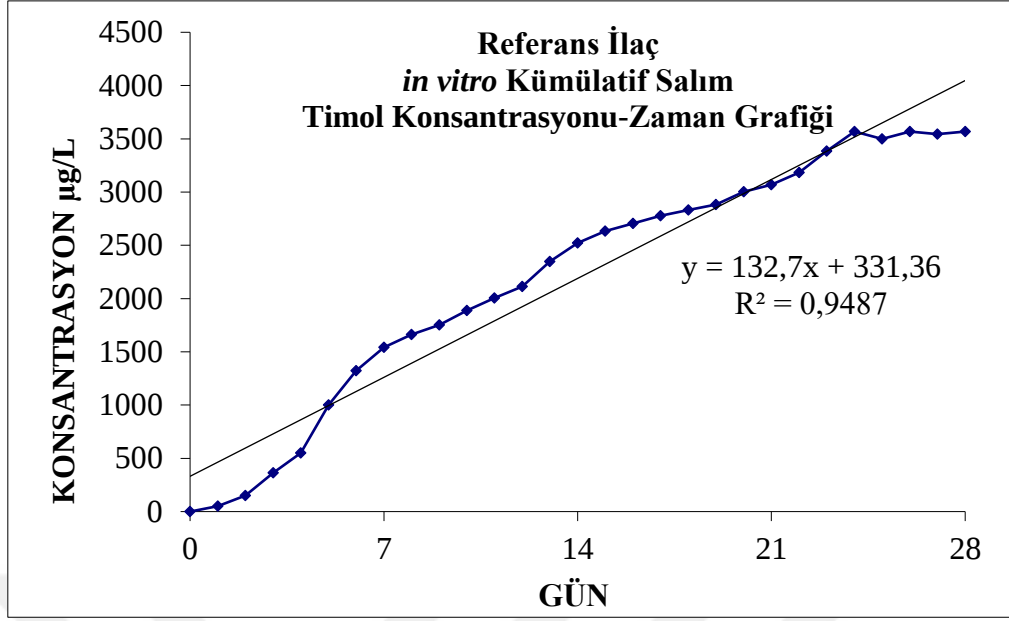
Şekil 3.11. Saf Timol *in vitro* Kümülatif Salım Konsantrasyon-Zaman Grafiği.



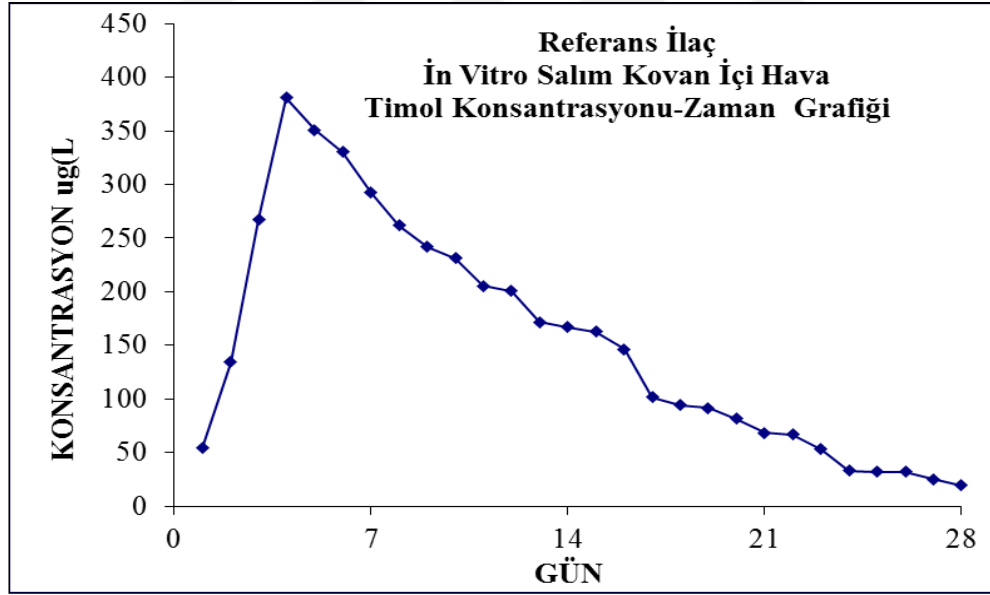
**Şekil 3.12.** Saf Timol *in vitro* Salım Kovan İçi Hava Timol Konsantrasyonu-Zaman Grafiği.

Gravimetrik ölçümlerde; 12,5 g saf timol içeren pozitif kontrol ilacından 4 hafta sonunda 2,69 g timol salımı gerçekleşti.

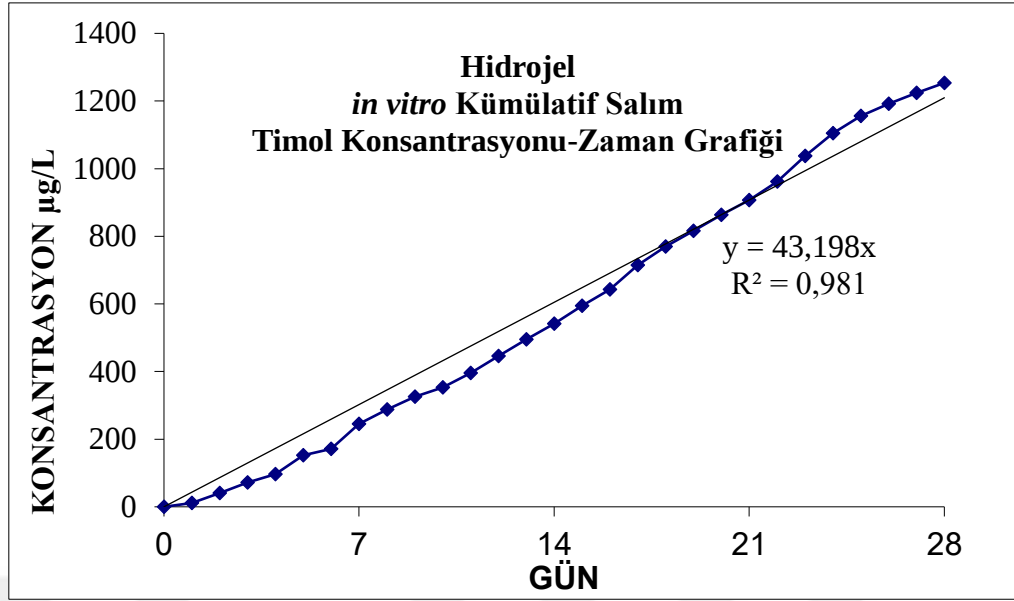
HPLC-DAD ile yapılan ölçümlerde süblimleşen timolün, %34'ünün (0,91 g) kovan çeperine adsorbe olduğu, %66'sının (1,77 g) çözücü tuzaklarında tutulduğu, *in vitro* kümülatif salım konsantrasyon-salım grafiği incelendiğinde dört haftalık süre içerisinde birinci derece salım tipi sergilediği belirlendi.



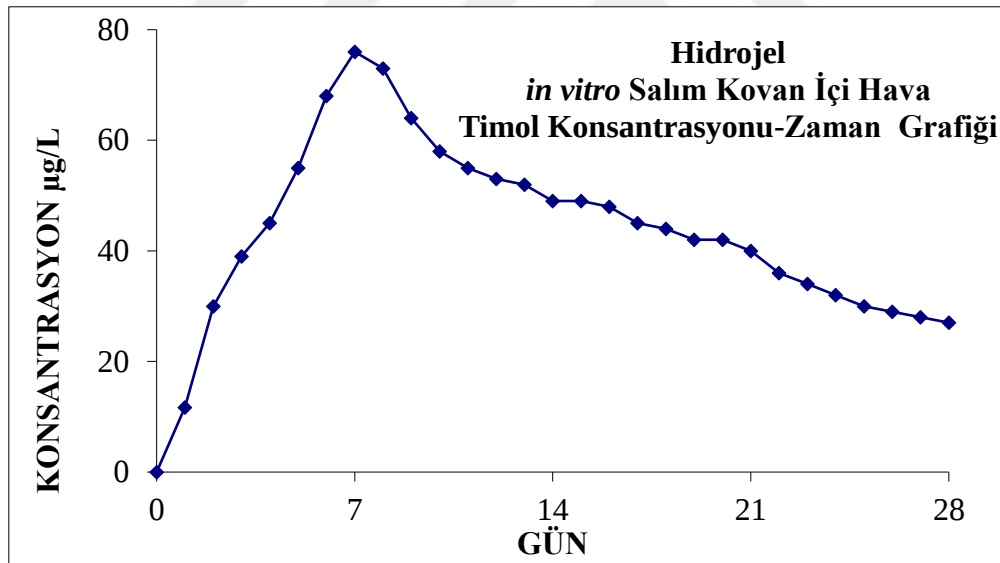
**Şekil 3.13.** Referans İlaç *in vitro* Kümülatif Salım Timol Konsantrasyonu-Zaman Grafiği.



**Şekil 3.14.** Referans İlaç *in vitro* Salım Kovan İçi Hava Timol Konsantrasyonu-Zaman Grafiği.



Şekil 3.15. Hidrojel in vitro Kümülatif Salım Konsantrasyon-Zaman Grafiği.



Şekil 3.16. Hidrojel in vitro Salım Kovan İçer Hava Timol Konsantrasyonu-Zaman Grafiği.

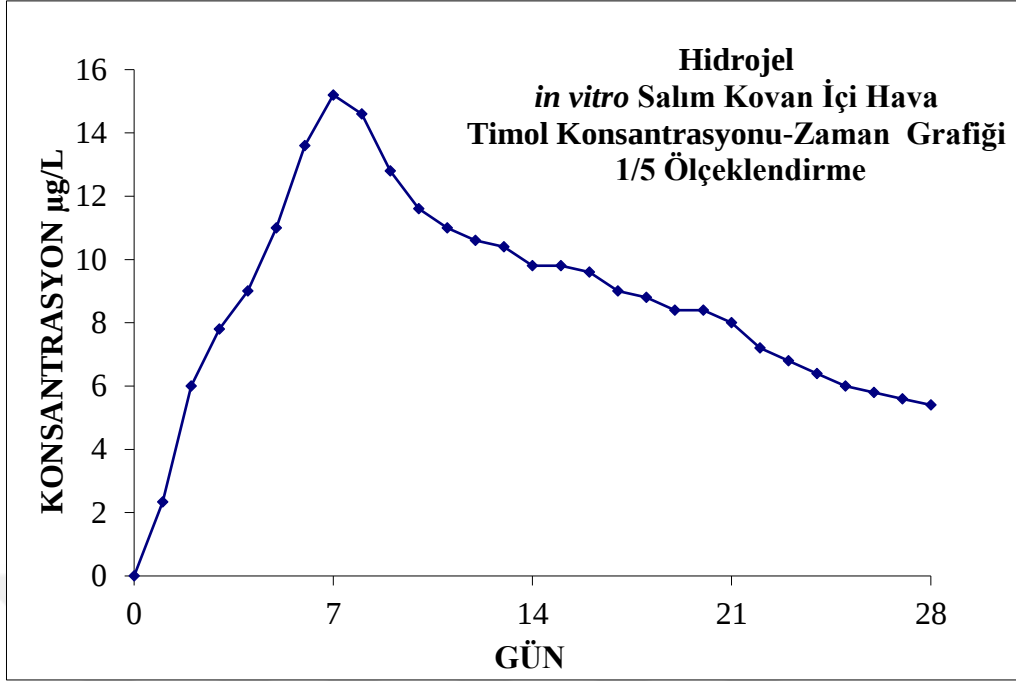
Gravimetrik ölçümlerde; 12,5 g saf timol içeren hidrojelden 4 hafta sonunda 1,87 g salım gerçekleşti.

HPLC-DAD ile yapılan ölçümlerde süblimleşen timolün, %49'unun (0,91 g) kovan çeperine adsorbe olduğu, %51'inin (0,96 g) çözücü tuzaklarında tutulduğu, *in vitro* kümülatif salım konsantrasyon-salım grafiği incelendiğinde dört haftalık süre içerisinde sıfırıncı derece salım tipi sergilediği belirlendi.

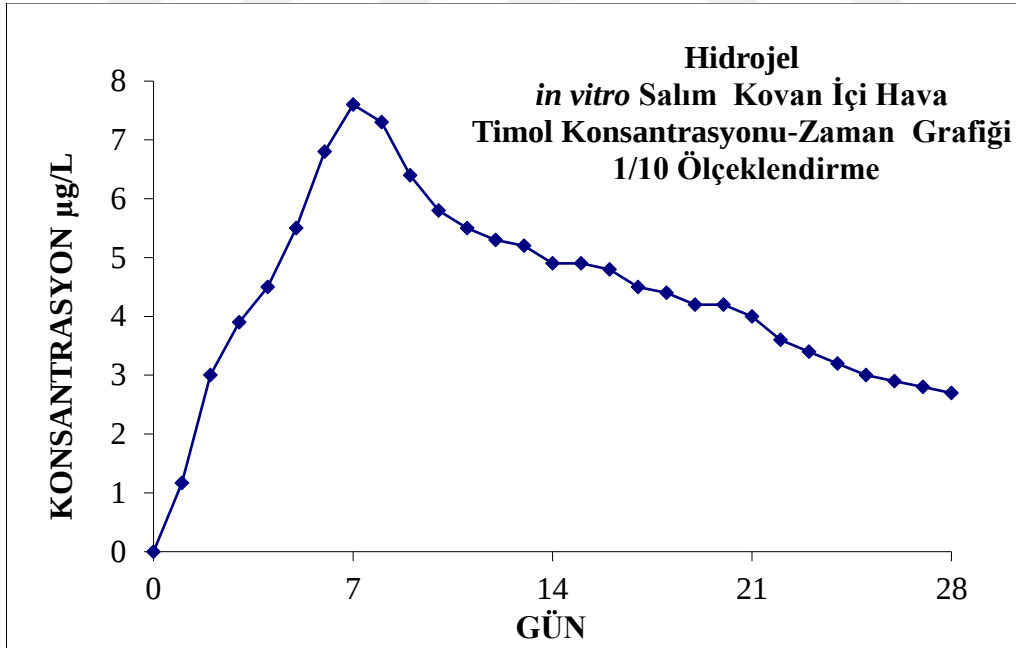
Eşit deneysel şartlar, eşit süreler ve eşit miktarda etkin madde içeren saf timol, pozitif kontrol ilacı (referans ilaç) ve hidrojel için *in vitro* koşullarda elde edilen kovan içi bir litre havadaki timol konsantrasyonları dikkate alındığında; Imdorf ve ark. (1995), tarafından belirtilen 5-15 µg/L hava konsantrasyonlarındaki sağaltım penceresinin dışına çıktığı gözlemlendi.

Antibakteriyellerin *in vitro* ortamda elde edilen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin *in vivo* ortamda elde edilebilmesi için uygulanan ilaç miktarı veya titresinin 1 ila 10 kat artırıldığı bildirilmektedir (Kaya, 2007). Bu örnekten hareketle *in vitro* ortamda ölçülen kovan içi bir litre havadaki timol konsantrasyonları 1/5 ve 1/10 oranlarında ölçeklendirilerek teorik olarak *in vivo* ortamda oluşabilecek konsantrasyonlar için grafikler oluşturuldu. Elde edilen grafiklerde her iki ölçeklendirme için teorik olarak sağaltım penceresine uyumlu bir salım şekillenmektedir.

Sağaltım penceresi konsantrasyonlarına uyumlu olacağı ön görülen konsantrasyonların, antiparaziter ilaçların *in vivo* ortamda uygulanacak miktarlarının belirlenmesi için önerilen doz titrasyon ve doz doğrulama çalışmaları (Anon, 2021a) ile bal arısı kolonilerinde akarisidal etkinlik ve hedef tür toleransı bakımından klinik olarak doğrulanmasına karar verildi.



**Şekil 3.17.** Hidrojel *in vitro* Salım Kovan İçi Hava Timol Konsantrasyonu-Zaman Grafiği (1/5 Ölçeklendirme).



**Şekil 3.18.** Hidrojel *in vitro* Salım Kovan İçi Hava Timol Konsantrasyonu-Zaman Grafiği (1/10 Ölçeklendirme).

### 3.7. *İn vivo* Doz Titrasyon-Doz Doğrulama ve Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışmaları Bulguları

*İn vivo* çalışmalar öncesi koloni sağlık kontrollerinde, örneklenen kolonilerin tümünde *Varroa* spp. akarı tespit edildi. Kolonilerde varroosis enfestasyonu oranının %2 ile %4 arasında değiştiği tespit edildi.

Kolonilerden alınan numunelerin, belirtilen metot ile gerçekleştirilen analizleri sonucunda hiçbir numunede Çizelge 2.1.'de belirtilen pestisitler için ölçüm limiti (LOQ) düzeyinde pestisite rastlanmadı.

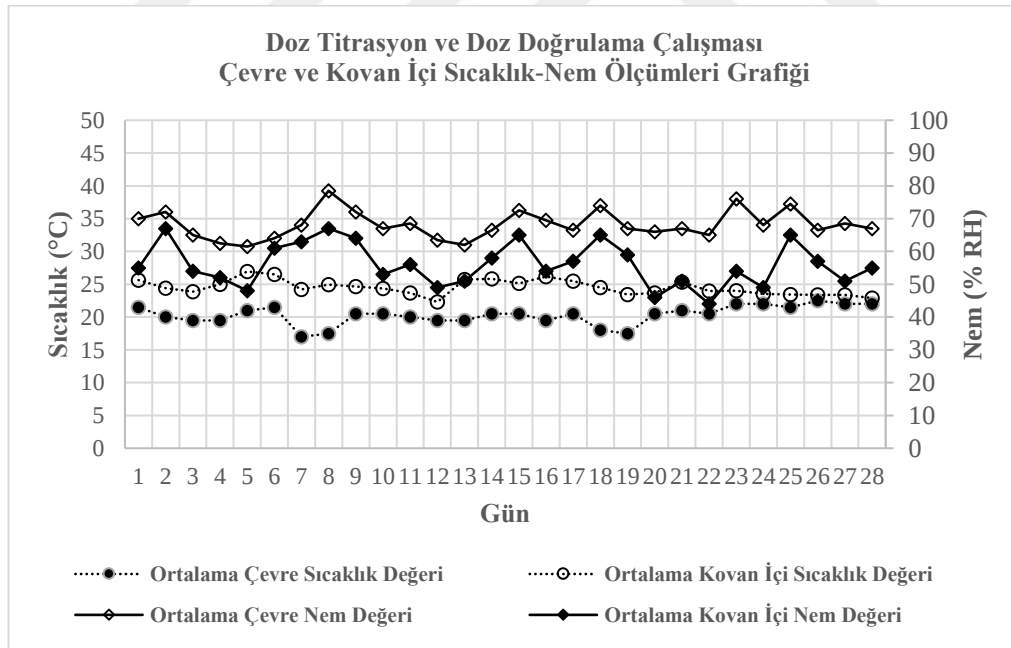
Kolonilerden alınan tüm arı numunelerinde yapılan *Nosema* spp. spor taraması sonucu herhangi bir numunenin 1 milyon üzeri spor içermediği saptandı. Bu sonuçlar ışığında kolonilerin *in vivo* çalışmalarda kullanılabilecekleri kanaatine varıldı.

**Çizelge 3.6.** Doz Titrasyon-Doz Doğrulama Çalışması Akarisidal Etkilik Bulguları.

| Sağaltım Grubu        | Kovan No | Sağaltım Öncesi Enfestasyon Düzeyi % | Sağaltım Sonrası Enfestasyon Düzeyi % | Akarisidal Etkinlik % |
|-----------------------|----------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| Negatif Kontrol Grubu | NK 1     | 2                                    | 3                                     | 33                    |
|                       | NK 2     | 4                                    | 5                                     | 22                    |
|                       | NK 3     | 3                                    | 4                                     | 25                    |
|                       | NK 4     | 2                                    | 3                                     | 33                    |
|                       | NK 5     | 3                                    | 4                                     | 25                    |
|                       | Ortalama | 2,8                                  | 3,8                                   | 27,6                  |
| Test Grubu-1          | T 1-1    | 3                                    | 2                                     | 51                    |
|                       | T 1-2    | 3                                    | 2                                     | 51                    |
|                       | T 1-3    | 4                                    | 2,3                                   | 58                    |
|                       | T 1-4    | 3                                    | 2                                     | 51                    |
|                       | T 1-5    | 3                                    | 1,33                                  | 67                    |
|                       | Ortalama | 3,2                                  | 1,92                                  | 55,6                  |
| Test Grubu-2          | T 2-1    | 4                                    | 1,66                                  | 69                    |
|                       | T 2-2    | 3                                    | 1,33                                  | 67                    |
|                       | T 2-3    | 2                                    | 0,33                                  | 88                    |
|                       | T 2-4    | 3                                    | 1,00                                  | 75                    |
|                       | T 2-5    | 3                                    | 0,66                                  | 84                    |
|                       | Ortalama | 3                                    | 0,99                                  | 76,6                  |

**Çizelge 3.7.** Doz Titrasyon-Doz Doğrulama Çalışması Hedef Tür Tolerans Düzeyi Bulguları.

| Sağaltım Grubu               | Kovan No | Ölen Arı Sayısı (adet) |         |         |         |        |
|------------------------------|----------|------------------------|---------|---------|---------|--------|
|                              |          | 1 hafta                | 2 hafta | 3 hafta | 4 hafta | Toplam |
| <b>Negatif Kontrol Grubu</b> | NK 1     | 15                     | 8       | 14      | 9       | 46     |
|                              | NK 2     | 12                     | 6       | 12      | 8       | 38     |
|                              | NK 3     | 21                     | 13      | 8       | 12      | 54     |
|                              | NK 4     | 10                     | 15      | 8       | 7       | 40     |
|                              | NK 5     | 16                     | 9       | 17      | 11      | 53     |
|                              | Ortalama |                        |         |         |         | 46,2   |
| <b>Test Grubu-1</b>          | T 1-1    | 28                     | 11      | 14      | 9       | 62     |
|                              | T 1-2    | 23                     | 12      | 20      | 11      | 66     |
|                              | T 1-3    | 28                     | 13      | 9       | 6       | 56     |
|                              | T 1-4    | 19                     | 10      | 14      | 8       | 51     |
|                              | T 1-5    | 25                     | 14      | 10      | 13      | 62     |
|                              | Ortalama |                        |         |         |         | 59,4   |
| <b>Test Grubu-2</b>          | T 2-1    | 27                     | 12      | 8       | 10      | 57     |
|                              | T 2-2    | 32                     | 15      | 12      | 14      | 73     |
|                              | T 2-3    | 24                     | 16      | 11      | 14      | 65     |
|                              | T 2-4    | 28                     | 13      | 8       | 9       | 58     |
|                              | T 2-5    | 36                     | 12      | 7       | 18      | 73     |
|                              | Ortalama |                        |         |         |         | 65,2   |



**Şekil 3.19.** *İn vivo* Doz Titrasyon- Doz Doğrulama Çalışması Sıcaklık-Nem Ölçümleri.

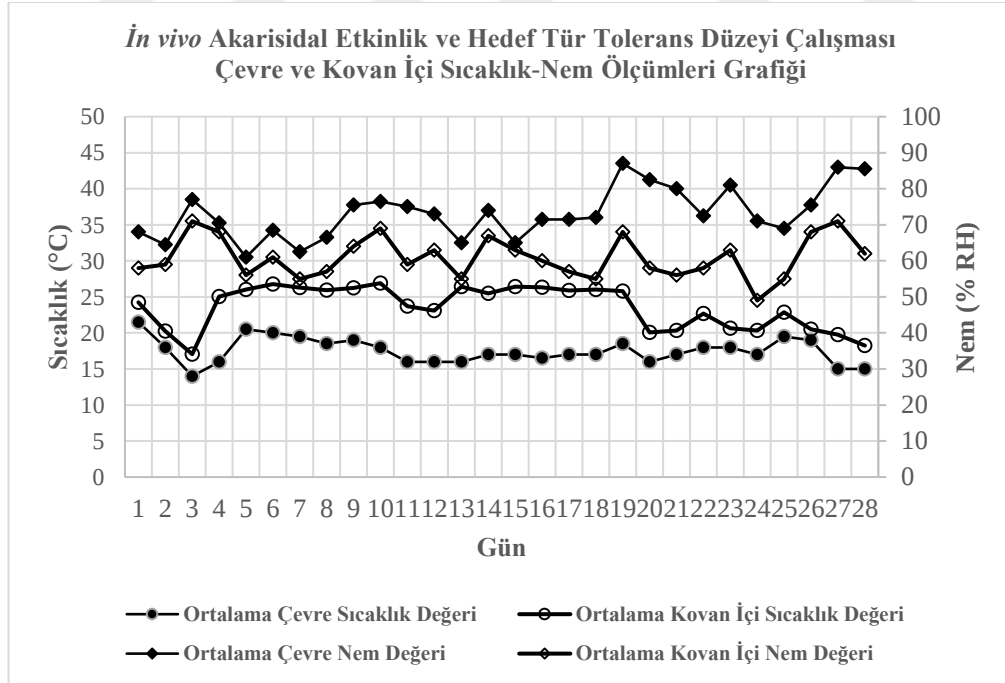
Arılık bölgesine yerleştirilen datalogger cihazı ile çalışma süresi içerisinde; gündüz için en yüksek çevre sıcaklığı 28 °C, en düşük çevre sıcaklığı 19°C olarak ölçüldü. Gece için en yüksek sıcaklık 19 °C, en düşük sıcaklık 14 °C olarak ölçüldü. Çalışma boyunca en düşük sıcaklık olan 14 °C aralıklı olarak altı gece ölçüldü. Çevre neminin 48-91 % RH arasında değiştiği gözlemlendi. Kovanlarda çerçeveler üzerindeki bölgeye yerleştirilen data logger cihazları ile çalışma süresi içerisinde; gündüz için en yüksek sıcaklığı 27,5 °C, en düşük çevre sıcaklığı 20 °C olarak ölçüldü. Gece için en yüksek sıcaklık 25,6 °C, en düşük sıcaklık 20 °C olarak ölçüldü. Kovan içi neminin 44 ila 67 % RH arasında değiştiği gözlemlendi. Yağışlar aralıklı olarak toplamda altı gün boyunca ve genelde gece saatlerinde, hafif şiddette gerçekleşti. Çevresel koşullar kaynaklı kolonilerde huzursuzluk ve ana arı kaybı gibi herhangi bir olumsuzluk gözlenmedi.

**Çizelge 3.8.** *İn vivo* Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışması Sağaltım Grupları-Akarisidal Etkinlik Düzeyi Bulguları.

| Sağaltım Grubu               | Kovan No | Sağaltım ile Ölen Akar Sayısı (adet) |         |         |         | Takip Sağaltımında Ölen Akar Sayısı (adet) | Akarisidal Etkinlik % |
|------------------------------|----------|--------------------------------------|---------|---------|---------|--------------------------------------------|-----------------------|
|                              |          | 1 hafta                              | 2 hafta | 3 hafta | 4 hafta |                                            |                       |
| <b>Negatif Kontrol Grubu</b> | NK 1     | 21                                   | 15      | 34      | 19      | 312                                        | 22,19                 |
|                              | NK 2     | 32                                   | 17      | 29      | 45      | 405                                        | 23,30                 |
|                              | NK 3     | 40                                   | 12      | 19      | 12      | 346                                        | 19,35                 |
|                              | NK 4     | 25                                   | 19      | 9       | 34      | 372                                        | 18,95                 |
|                              | NK 5     | 12                                   | 34      | 17      | 51      | 327                                        | 25,85                 |
|                              | Ortalama |                                      |         |         |         |                                            | 21,93                 |
| <b>Pozitif Kontrol Grubu</b> | PK 1     | 213                                  | 96      | 121     | 48      | 102                                        | 82,41                 |
|                              | PK 2     | 184                                  | 92      | 105     | 78      | 132                                        | 77,66                 |
|                              | PK 3     | 203                                  | 102     | 78      | 63      | 94                                         | 82,59                 |
|                              | PK 4     | 184                                  | 79      | 71      | 49      | 97                                         | 79,79                 |
|                              | PK 5     | 174                                  | 98      | 68      | 85      | 87                                         | 83,01                 |
|                              | Ortalama |                                      |         |         |         |                                            | 81,09                 |
| <b>Test Grubu</b>            | T 1      | 114                                  | 68      | 43      | 52      | 109                                        | 71,76                 |
|                              | T 2      | 103                                  | 87      | 58      | 36      | 121                                        | 70,12                 |
|                              | T 3      | 128                                  | 82      | 51      | 38      | 138                                        | 68,42                 |
|                              | T 4      | 91                                   | 122     | 64      | 39      | 117                                        | 72,98                 |
|                              | T 5      | 87                                   | 64      | 35      | 21      | 96                                         | 68,32                 |
|                              | Ortalama |                                      |         |         |         |                                            | 70,32                 |

**Çizelge 3.9.** *İn vivo* Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışması, Sağaltım Grubu- Hedef Tür Tolerans Düzeyi Bulguları.

| Sağaltım Grubu        | Kovan No | Ölen Arı Sayısı (adet) |         |         |         |        |
|-----------------------|----------|------------------------|---------|---------|---------|--------|
|                       |          | 1 hafta                | 2 hafta | 3 hafta | 4 hafta | Toplam |
| Negatif Kontrol Grubu | NK 1     | 22                     | 15      | 9       | 21      | 67     |
|                       | NK 2     | 19                     | 22      | 14      | 12      | 67     |
|                       | NK 3     | 17                     | 11      | 8       | 13      | 49     |
|                       | NK 4     | 21                     | 20      | 16      | 8       | 65     |
|                       | NK 5     | 9                      | 17      | 14      | 16      | 56     |
|                       | Ortalama |                        |         |         |         | 60,8   |
| Pozitif Kontrol Grubu | PK 1     | 174                    | 36      | 58      | 33      | 301    |
|                       | PK 2     | 200                    | 43      | 61      | 28      | 332    |
|                       | PK 3     | 127                    | 41      | 72      | 35      | 275    |
|                       | PK 4     | 96                     | 65      | 87      | 43      | 291    |
|                       | PK 5     | 135                    | 54      | 62      | 37      | 288    |
|                       | Ortalama |                        |         |         |         | 297,4  |
| Test Grubu            | T 1      | 29                     | 26      | 21      | 13      | 89     |
|                       | T 2      | 38                     | 19      | 17      | 9       | 83     |
|                       | T 3      | 41                     | 18      | 9       | 13      | 81     |
|                       | T 4      | 34                     | 25      | 20      | 19      | 98     |
|                       | T 5      | 32                     | 21      | 12      | 18      | 83     |
|                       | Ortalama |                        |         |         |         | 86,8   |



**Şekil 3.20.** *İn vivo* Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışması Sıcaklık-Nem Ölçümleri.

Arılık bölgesine yerleştirilen datalogger cihazı ile çalışma süresi içerisinde; gündüz için en yüksek çevre sıcaklığı 26 °C, en düşük çevre sıcaklığı 16°C olarak ölçüldü. Gece için en yüksek sıcaklık 18 °C, en düşük sıcaklık 11 °C olarak ölçüldü. Çalışma boyunca 15 °C altındaki sıcaklık aralıklı olarak on sekiz gece ölçüldü ve günlük ortalama çevre sıcaklığı bakımından hiçbir çalışma günü için 15 °C altında sıcaklık değeri gözlenmedi. Çevre neminin 41-91 % RH arasında değiştiği gözlemlendi. Kovanlarda çerçeveler üzerindeki bölgeye yerleştirilen datalogger cihazları ile çalışma süresi içerisinde; gündüz için en yüksek sıcaklık 27,6 °C, en düşük sıcaklık 19,6 °C olarak ölçüldü. Gece için en yüksek sıcaklık 26,2 °C, en düşük sıcaklık 14,5 °C olarak ölçüldü. Çalışma boyunca en düşük kovan içi sıcaklık olan 14,5 °C bir gece için ölçüldü. Kovan içi neminin 49 ila 71 % RH arasında değiştiği gözlemlendi. Yağışlar toplamda on iki günde, hafif ve orta şiddette gün içerisinde birkaç saat aralıklı olarak gerçekleşti. Çevresel koşullar kaynaklı kolonilerde huzursuzluk ve ana arı kaybı gibi herhangi bir olumsuzluk gözlenmedi.

### 3.8. Bal ve Bal Mumunda Kalıntı Düzeyi Araştırma Bulguları

Bal ve bal mumu numuneleri kromatogramlarında timol ve p-cumenol pik alıkonma zamanlarında herhangi bir girişim gözlenmedi. Bu durumda metodun seçici olduğu kabul edildi. Bal ve bal mumunda geri kazanım oranları sırasıyla %99,93 ve %100,6 olarak tespit edildi.

**Çizelge 3.10.** Timol Uygulanan Kolonilerde Bal ve Bal Mumunda Timol Kalıntı Düzeyi Araştırma Bulguları.

| Sağaltım grubu    | Bal<br>timol kalıntı düzeyi (mg/kg) |                 | Balmumu<br>timol kalıntı düzeyi (mg/kg) |                 |
|-------------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------------------------------|-----------------|
|                   | Çalışma öncesi                      | Çalışma sonrası | Çalışma öncesi                          | Çalışma sonrası |
| Negatif Kontrol 1 | 0,049                               | 0,025           | 0,136                                   | 0,085           |
| Negatif Kontrol 1 | 0,080                               | TEDB            | TEDB                                    | TEDB            |
| Negatif Kontrol 1 | 0,078                               | 0,053           | 0,160                                   | 0,122           |
| Negatif Kontrol 1 | 0,073                               | 0,050           | 0,157                                   | 0,100           |
| Negatif Kontrol 1 | 0,069                               | 0,022           | 0,082                                   | 0,064           |
| Ortalama          | 0,070                               | 0,038           | 0,134                                   | 0,093           |
| Pozitif Kontrol 1 | 0,049                               | 9,369           | 0,107                                   | 0,940           |
| Pozitif Kontrol 2 | 0,081                               | 4,199           | TEDB                                    | 2,764           |
| Pozitif Kontrol 3 | 0,095                               | 2,139           | TEDB                                    | 1,140           |
| Pozitif Kontrol 4 | TEDB                                | 3,019           | 0,135                                   | 2,417           |
| Pozitif Kontrol 5 | 0,075                               | 8,766           | 0,142                                   | 1,073           |
| Ortalama          | 0,075                               | 5,498           | 0,128                                   | 1,667           |
| Test 1            | TEDB                                | 0,076           | 0,138                                   | 0,764           |
| Test 2            | TEDB                                | 0,074           | 0,145                                   | 0,317           |
| Test 3            | 0,060                               | 0,126           | TEDB                                    | 0,200           |
| Test 4            | 0,089                               | 0,324           | 0,034                                   | 0,788           |
| Test 5            | 0,085                               | 0,240           | 0,139                                   | 0,309           |
| Ortalama          | 0,078                               | 0,168           | 0,114                                   | 0,476           |

\*TEDB: Tespit edilebilir düzeyde bulunamadı.

### 3.9. Bulguların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

**Çizelge 3.11.** *In vivo* Çalışmalarda Elde Edilen Verilerin Normal Dağılım Testi Sonuçları.

| Doz Titrasyon-Doz Doğrulama Çalışması<br>Akarisidal Etkinlik Verileri Normal Dağılım Testi<br><u>Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup></u>               |           |    |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|----|--------|
|                                                                                                                                                   | Statistic | df | Sig.   |
| Negatif Kontrol Grubu                                                                                                                             | 0,296     | 5  | 0,176* |
| Test Grubu-1                                                                                                                                      | 0,343     | 5  | 0,055* |
| Test Grubu-2                                                                                                                                      | 0,196     | 5  | 0,200* |
| Doz Titrasyon-Doz Doğrulama Çalışması<br>Hedef Tür Tolerans Verilerinin Normal Dağılım Testi<br><u>Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup></u>             |           |    |        |
|                                                                                                                                                   | Statistic | df | Sig.   |
| Negatif Kontrol Grubu                                                                                                                             | 0,224     | 5  | 0,200* |
| Test Grubu-1                                                                                                                                      | 0,270     | 5  | 0,200* |
| Test Grubu-2                                                                                                                                      | 0,243     | 5  | 0,200* |
| Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Çalışması<br>Akarisidal Etkinlik Verilerinin Normal Dağılım Testi<br><u>Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup></u> |           |    |        |
|                                                                                                                                                   | Statistic | df | Sig.   |
| Negatif Kontrol Grubu                                                                                                                             | 0,216     | 5  | 0,200* |
| Pozitif Grubu                                                                                                                                     | 0,317     | 5  | 0,113  |
| Test Grubu                                                                                                                                        | 0,223     | 5  | 0,200* |
| Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Çalışması<br>Hedef Tür Tolerans Verileri Normal Dağılım Testi<br><u>Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup></u>     |           |    |        |
|                                                                                                                                                   | Statistic | df | Sig.   |
| Negatif Kontrol Grubu                                                                                                                             | 0,300     | 5  | 0,161* |
| Pozitif Grubu                                                                                                                                     | 0,233     | 5  | 0,200* |
| Test Grubu                                                                                                                                        | 0,308     | 5  | 0,137* |
| Balda Timol Kalıntı Çalışması<br>Verilerinin Normal Dağılım Testi<br><u>Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup></u>                                        |           |    |        |
|                                                                                                                                                   | Statistic | df | Sig.   |
| Negatif Kontrol Grubu                                                                                                                             | 0,274     | 5  | 0,200* |
| Pozitif Grubu                                                                                                                                     | 0,251     | 5  | 0,200* |
| Test Grubu                                                                                                                                        | 0,248     | 5  | 0,200* |
| Bal Mumunda Timol Kalıntı Çalışması<br>Verilerinin Normal Dağılım Testi<br><u>Kolmogorov-Smirnov<sup>a</sup></u>                                  |           |    |        |
|                                                                                                                                                   | Statistic | df | Sig.   |
| Negatif Kontrol Grubu                                                                                                                             | 0,213     | 5  | 0,200* |
| Pozitif Grubu                                                                                                                                     | 0,331     | 5  | 0,077* |
| Test Grubu                                                                                                                                        | 0,316     | 5  | 0,116* |

\*(p> 0,05).

Doz titrasyon-doz doğrulama çalışması ile akarisidal etkinlik ve hedef tür tolerans çalışmalarında elde edilen; akarisidal etkinlik, hedef tür tolerans, bal ve

bal mumunda timol kalıntısı düzeyi verilerin yapılan Kolmogorov-Smirnov testi sonucu normal dağılım gösterdiği tespit edildi ( $p > 0,05$ ).

Verilerin normal dağılım gösterdiğinin belirlenmesini takiben, sağaltım grupları arasındaki olası farkın araştırılması için tek yönlü varyans testi (One way ANOVA) kullanıldı. Varyans analizi sonrası istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmesi durumunda ( $p < 0,05$ ).Tukey HSD yöntemi ile gruplar kendi aralarında karşılaştırılarak istatistiksel farklılık oluşturan gruplar belirlendi.

Doz titrasyon-doğrulama çalışması sonrası hesaplanan akarisidal etkinlik verilerinin tek yönlü varyans testi ile analizleri sonucu anlamlı düzeyde ( $p < 0,05$ ) fark tespit edildi. Farkın hangi grup veya gruplardan kaynaklandığını belirlemek için Tukey HSD yöntemi kullanıldı. Tüm sağaltım grupları arasında akarisidal etkinlik düzeyi bakımından anlamlı düzeyde ( $p < 0,05$ ) fark tespit edildi.

**Çizelge 3.12.** Doz Titrasyon-Doz Doğrulama Çalışması Akarisidal Etkinlik Verilerinin İstatistiksel Analizi.

| <b>Doz Titrasyon-Doz Doğrulama Çalışması Akarisidal Etkinlik Verileri</b> |                       |                    |                      |               |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|---------------|
| <b><u>Tek Yönlü Varyans Testi</u></b>                                     |                       |                    |                      |               |
|                                                                           | Kareler toplamı       | df                 | Kareler ortalaması F | Sig.          |
| Gruplar arası                                                             | 6043,333              | 2                  | 3021,667             | 56,692 0,000* |
| Gruplar içi                                                               | 639,600               | 12                 | 53,300               |               |
| Toplam                                                                    | 6682,933              | 14                 |                      |               |
| <b>Doz Titrasyon-Doz Doğrulama Çalışması Akarisidal Etkinlik Verileri</b> |                       |                    |                      |               |
| <b>Post Hoc Tukey HSD ile Değerlendirme</b>                               |                       |                    |                      |               |
|                                                                           |                       | Ortalama farklılık | Standart Hata        | Sig.          |
| Negatif Kontrol Grubu                                                     | Test Grubu-1          | -28,00000*         | 4,61736              | 0,000*        |
|                                                                           | Test Grubu-2          | -49,00000*         | 4,61736              | 0,000*        |
| Test Grubu-1                                                              | Negatif Kontrol Grubu | 28,00000*          | 4,61736              | 0,000*        |
|                                                                           | Test Grubu-2          | -21,00000*         | 4,61736              | 0,002*        |
| Test Grubu-2                                                              | Negatif Kontrol Grubu | 49,00000*          | 4,61736              | 0,000*        |
|                                                                           | Test Grubu-1          | 21,00000*          | 4,61736              | 0,002*        |

\*( $p < 0,05$ ).

Doz Titrasyon-Doz Doğrulama Çalışması sonrası hesaplanan hedef tür tolerans verilerinin Tek Yönlü Varyans Testi ile analizi sonucu anlamlı düzeyde

fark tespit edildi ( $p < 0,05$ ). Farkın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için Tukey HSD yöntemi kullanıldı. Negatif kontrol grubu ile Test-1 grubu arasında anlamlı fark tespit edilemedi. Negatif kontrol grubu ile Test-2 grubu arasında anlamlı fark tespit edildi. Test-1 grubu ile Test-2 grubu arasında anlamlı fark tespit edilmedi ( $p < 0,05$ ).

**Çizelge 3.13.** Doz Titrasyon-Doz Doğrulama Çalışması Hedef Tür Tolerans Verilerinin İstatistiksel Analizi.

| <b>Doz Titrasyon-Doz Doğrulama Çalışması Hedef Tür Tolerans Verileri</b> |                       |                    |                    |        |        |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|--------|--------|
| <b><u>Tek Yönlü Varyans Testi</u></b>                                    |                       |                    |                    |        |        |
|                                                                          | Kareler toplamı       | df                 | Kareler ortalaması | F      | Sig.   |
| Gruplar arası                                                            | 948,133               | 2                  | 474,067            | 9,596  | 0,003* |
| Gruplar içi                                                              | 592,800               | 12                 | 49,400             |        |        |
| Toplam                                                                   | 1540,933              | 14                 |                    |        |        |
| <b>Doz Titrasyon-Doz Doğrulama Çalışması Hedef Tür Tolerans Verileri</b> |                       |                    |                    |        |        |
| <b><u>Post Hoc Tukey HSD ile Değerlendirme</u></b>                       |                       |                    |                    |        |        |
|                                                                          |                       | Ortalama farklılık | Standart Hata      | Sig.   |        |
| Negatif Kontrol Grubu                                                    | Test Grubu-1          | -13,20000          | 4,44522            | 0,029  |        |
|                                                                          | Test Grubu-2          | -19,00000*         | 4,44522            | 0,003* |        |
| Test Grubu-1                                                             | Negatif Kontrol Grubu | 13,20000           | 4,44522            | 0,029  |        |
|                                                                          | Test Grubu-2          | -5,80000           | 4,44522            | 0,419  |        |
| Test Grubu-2                                                             | Negatif Kontrol Grubu | 19,00000*          | 4,44522            | 0,003* |        |
|                                                                          | Test Grubu-1          | 5,80000            | 4,44522            | 0,419  |        |

\*( $p < 0,05$ ).

Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışmasında hesaplanan akarisidal etkinlik verilerinin Tek Yönlü Varyans Testi ile analizi sonucu anlamlı düzeyde ( $p < 0,05$ ) fark tespit edildi. Farkın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için Tukey HSD yöntemi kullanıldı. Tüm gruplar arasında akarisidal etkinlik düzeyi bakımından anlamlı düzeyde fark tespit edildi ( $p < 0,05$ ).

**Çizelge 3.14.** Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışması Akarisidal Etkinlik Verilerinin İstatistiksel Analizi.

| <b>Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışması Akarisidal Etkinlik Verileri</b> |                       |                    |                    |         |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|---------|--------|
| <b><u>Tek Yönlü Varyans Testi</u></b>                                                       |                       |                    |                    |         |        |
|                                                                                             | Kareler toplamı       | df                 | Kareler ortalaması | F       | Sig.   |
| Gruplar arası                                                                               | 9930,334              | 2                  | 4965,167           | 841,785 | 0,000* |
| Gruplar içi                                                                                 | 70,781                | 12                 | 5,898              |         |        |
| Toplam                                                                                      | 10001,115             | 14                 |                    |         |        |
| <b>Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışması Akarisidal Etkinlik Verileri</b> |                       |                    |                    |         |        |
| <b><u>Post Hoc Tukey HSD ile Değerlendirme</u></b>                                          |                       |                    |                    |         |        |
|                                                                                             |                       | Ortalama farklılık | Standart Hata      | Sig.    |        |
| Negatif Kontrol Grubu                                                                       | Pozitif Kontrol Grubu | -59,16400*         | 1,53602            | 0,000*  |        |
|                                                                                             | Test Grubu            | -48,39200*         | 1,53602            | 0,000*  |        |
| Pozitif Kontrol Grubu                                                                       | Negatif Kontrol Grubu | 59,16400*          | 1,53602            | 0,000*  |        |
|                                                                                             | Test Grubu            | 10,77200*          | 1,53602            | 0,000*  |        |
| Test Grubu                                                                                  | Negatif Kontrol Grubu | 48,39200*          | 1,53602            | 0,000*  |        |
|                                                                                             | Pozitif Kontrol Grubu | -10,77200*         | 1,53602            | 0,000*  |        |

\*(p < 0,05).

Akarisidal etkinlik-hedef tür tolerans düzeyi çalışması sonrası hesaplanan hedef tür tolerans verilerinin Tek Yönlü Varyans Testi ile analizi sonucu anlamlı düzeyde fark tespit edildi ( $p < 0,05$ ). Farkın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için Tukey HSD yöntemi kullanıldı. Negatif kontrol grubu ile test grubu arasında hedef tür tolerans düzeyi bakımından anlamlı düzeyde fark tespit edilemedi ( $p < 0,05$ ). Negatif kontrol grubu ile pozitif kontrol grubu arasında ve test grubu ile pozitif kontrol grubu arasında hedef tür tolerans düzeyi bakımından anlamlı düzeyde fark tespit edildi ( $p < 0,05$ ).

**Çizelge 3.15.** Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışması, Hedef Tür Tolerans Verilerinin İstatistiksel Analizi.

| <b>Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışması Hedef Tür Tolerans Verileri</b> |                       |                    |                    |                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|----------------|
| <b><u>Tek Yönlü Varyans Testi</u></b>                                                      |                       |                    |                    |                |
|                                                                                            | Kareler toplamı       | df                 | Kareler ortalaması | F Sig.         |
| Gruplar arası                                                                              | 168346,533            | 2                  | 84173,267          | 440,929 0,000* |
| Gruplar içi                                                                                | 2290,800              | 12                 | 190,900            |                |
| Toplam                                                                                     | 170637,333            | 14                 |                    |                |
| <b>Akarisidal Etkinlik-Hedef Tür Tolerans Düzeyi Çalışması Hedef Tür Tolerans Verileri</b> |                       |                    |                    |                |
| <b><u>Post Hoc Tukey HSD ile Değerlendirme</u></b>                                         |                       |                    |                    |                |
|                                                                                            |                       | Ortalama farklılık | Standart Hata      | Sig.           |
| Negatif Kontrol Grubu                                                                      | Pozitif Kontrol Grubu | -236,6000*         | 8,73842            | 0,000*         |
|                                                                                            | Test Grubu            | -26,0000*          | 8,73842            | 0,029          |
| Pozitif Kontrol Grubu                                                                      | Negatif Kontrol Grubu | 236,6000*          | 8,73842            | 0,000*         |
|                                                                                            | Test Grubu            | 210,6000*          | 8,73842            | 0,000*         |
| Test Grubu                                                                                 | Negatif Kontrol Grubu | 26,00000*          | 8,73842            | 0,029          |
|                                                                                            | Pozitif Kontrol Grubu | -210,6000*         | 8,73842            | 0,000*         |

\*(p < 0,05).

Bal ve bal mumunda timol kalıntısı çalışmaları sonrası hesaplanan balda timol kalıntısı verilerinin tek yönlü varyans testi ile analizi sonucu anlamlı düzeyde fark tespit edildi (p< 0,05).

Farkın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için Tukey HSD yöntemi kullanıldı. Pozitif kontrol grubu ile negatif kontrol grubu ve pozitif kontrol grubu ile test grubu arasında balda timol kalıntı düzeyi bakımından anlamlı düzeyde fark tespit edildi (p< 0,05). Negatif kontrol grubu ile test grubu arasında balda timol kalıntı düzeyi bakımından anlamlı düzeyde fark tespit edilemedi (p< 0,05).

**Çizelge 3.16.** Bal ve Bal Mumunda Timol Kalıntısı Çalışması Balda Timol Kalıntısı Verilerinin İstatistiksel Analizi.

| <b>Balda Timol Kalıntısı Çalışması Verileri<br/>Tek Yönlü Varyans Testi ile Analizi</b>  |                       |                    |                    |        |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|--------|--------|
|                                                                                          | Kareler toplamı       | df                 | Kareler ortalaması | F      | Sig.   |
| Gruplar arası                                                                            | 97,226                | 2                  | 48,613             | 13,012 | 0,001* |
| Gruplar içi                                                                              | 44,831                | 12                 | 3,736              |        |        |
| Toplam                                                                                   | 142,057               | 14                 |                    |        |        |
| <b>Balda Timol Kalıntısı Çalışması Verileri<br/>Post Hoc Tukey HSD ile Değerlendirme</b> |                       |                    |                    |        |        |
|                                                                                          |                       | Ortalama farklılık | Standart Hata      | Sig.   |        |
| Negatif Kontrol Grubu                                                                    | Pozitif Kontrol Grubu | -5,46840*          | 1,22242            | 0,002* |        |
|                                                                                          | Test Grubu            | -,13800            | 1,22242            | 0,993  |        |
| Pozitif Kontrol Grubu                                                                    | Negatif Kontrol Grubu | 5,46840*           | 1,22242            | 0,002* |        |
|                                                                                          | Test Grubu            | 5,33040*           | 1,22242            | 0,002* |        |
| Test Grubu                                                                               | Negatif Kontrol Grubu | ,13800             | 1,22242            | 0,993  |        |
|                                                                                          | Pozitif Kontrol Grubu | -5,33040*          | 1,22242            | 0,002* |        |

\*(p < 0,05).

Bal ve bal mumunda timol kalıntısı çalışması sonrası hesaplanan bal mumunda timol kalıntısı verilerinin tek yönlü varyans testi ile analizi sonucu anlamlı düzeyde fark tespit edildi ( $p < 0,05$ ). Farkın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek için Tukey HSD yöntemi kullanıldı. Sadece pozitif kontrol grubu ile negatif kontrol grubu arasında bal mumunda timol kalıntı düzeyi bakımından anlamlı düzeyde fark tespit edildi ( $p < 0,05$ ). Negatif kontrol grubu ile test grubu arasında ve test grubu ile pozitif kontrol grubu arasında bal mumunda timol kalıntı düzeyi bakımından anlamlı düzeyde fark tespit edilemedi ( $p < 0,05$ ).

**Çizelge 3.17.** Bal ve Bal Mumunda Timol Kalıntısı Çalışması Bal Mumunda Timol Kalıntısı Verilerinin İstatistiksel Analizi.

| <b>Bal ve Bal Mumunda Timol Kalıntısı Çalışması Bal Mumunda Timol Kalıntısı Verileri<br/>Tek Yönlü Varyans Testi ile Analizi</b>  |                       |                    |                    |        |        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|--------|--------|
|                                                                                                                                   | Kareler toplamı       | df                 | Kareler ortalaması | F      | Sig.   |
| Gruplar arası                                                                                                                     | 6,861                 | 2                  | 3,430              | 12,692 | 0,001* |
| Gruplar içi                                                                                                                       | 3,243                 | 12                 | ,270               |        |        |
| Toplam                                                                                                                            | 10,104                | 14                 |                    |        |        |
| <b>Bal ve Bal Mumunda Timol Kalıntısı Çalışması Bal Mumunda Timol Kalıntısı Verileri<br/>Post Hoc Tukey HSD ile Değerlendirme</b> |                       |                    |                    |        |        |
|                                                                                                                                   |                       | Ortalama farklılık | Standart Hata      | Sig.   |        |
| Negatif Kontrol Grubu                                                                                                             | Pozitif Kontrol Grubu | -1,59260*          | ,32880             | 0,001* |        |
|                                                                                                                                   | Test Grubu            | -,40140            | ,32880             | 0,464  |        |
| Pozitif Kontrol Grubu                                                                                                             | Negatif Kontrol Grubu | 1,59260*           | ,32880             | 0,001* |        |
|                                                                                                                                   | Test Grubu            | 1,19120*           | ,32880             | 0,009  |        |
| Test Grubu                                                                                                                        | Negatif Kontrol Grubu | ,40140             | ,32880             | 0,464  |        |
|                                                                                                                                   | Pozitif Kontrol Grubu | -1,19120*          | ,32880             | 0,009  |        |

\*(p < 0,05).

#### 4. TARTIŞMA

Arılar ekosistem için son derece önemli canlılardır. Bal arısı, ürettiği bal ve diğer arıcılık ürünlerin yanında asıl olarak bitkilerde tozlaşmayı gerçekleştirerek tarım ürünlerinin nicelik ve nitelik yönünden üstün olmasıyla daha büyük bir ekonomik getiri sağlamaktadır (Daş ve Aksoy, 2015; Fıratlı ve ark., 2010 ve Semerci, 2017). Arılarda ölüm veya verim düşüşlerinin en yaygın sebebinin, *Varroa destructor* adı verilen arı akarı tarafından oluşturulan varroosis enfestasyonu olduğu bildirilmektedir (Ayan ve ark., 2017; Balkaya ve ark., 2016 ve Harris ve ark., 2019).

Zorunlu parazitismus özelliği gösteren *Varroa* akarına karşı çok sayıda mücadele yöntemi geliştirilmiş olup bunların başında kimyasal mücadele yöntemleri gelmektedir. Kimyasallar, doğru uygulama şekli, süresi ve dozajında varroosis mücadelesinde etkili olmakta ancak uygun olmayan kontrolsüz kullanımı ya da çevresel etkilerle uygulama süresi ve dozunun kontrol edilememesi sebebiyle, beklenen etkinlik elde edilememekte ve koloni sağlığı olumsuz etkilenmektedir. Bu durum antiparaziter direnç gelişimi ile kısıtlı mücadele seçeneklerinin azalmasına ve arı ürünleri ile çevrede oluşan kalıntılar yoluyla da ekosistemde yer alan tüm canlıların sağlığı için olumsuzluklara sebebiyet verebilmektedir (Akyol ve Özkök, 2005; Daş ve Aksoy, 2015 ve Tihelka, 2018).

Varroosis mücadelesinde entegre zararlı yöntemi ile mevcut kimyasal mücadele seçeneklerinin etkin kullanımı ve parazit popülasyonlarının sürekli olarak yönetilmesi, enfestasyonun kolonilerde ekonomik olarak zarar oluşturmayacak seviyelere indirilmesi amaçlanmakta, kimyasalların kullanımının azaltılması ile arıların potansiyel olarak zararlı kimyasallara maruz kalmasının azaltılması, arıcılık ürünlerindeki kalıntı düzeylerinin

sınırlandırılması, akarlar tarafından kimyasallara karşı direnç gelişiminin geciktirilmesi hedeflenmektedir (Harris ve ark., 2019).

Dünyada en yaygın kullanılan akarisidal etkili kimyasal maddeler ve antiparaziter direnç durumları incelendiğinde; amitraz, koumafos, flumetrin, fluvalinate için direnç tanımlandığı, ancak formik asit ve okzalik asit için henüz bir direnç tanımlanmadığı (Thielka, 2018) 1980'li yıllardan itibaren kullanılan timol için ise bir direnç vakası bildirilmektedir (Plettner ve ark., 2017).

Timol kolay süblimleşme özelliği nedeni ile saf toz halinde veya jel, ped, şerit gibi farmasötik formülasyonlarla akarisidal olarak foretik fazdaki erişkin *Varroa* akarlarına karşı mücadelede kullanılmaktadır (Anon, 2001). Arılarda ve akarlarda; muhtemelen GABA reseptörlerini, TRP ve TRPL kanallarını, Tiramin ve / veya Oktopamin reseptörlerini etkilediği bildirilmektedir (Blenau ve ark., 2011), GABA kapılı klorür kanalının bloke edilmesinin nöronal inhibisyonu azalttığı, bunun da merkezi sinir sisteminin aşırı uyarılmasına, konvülsiyonlara ve nihai ölüme yol açtığı bildirilmektedir (Bisrat ve Jung, 2020).

Timol benzeri uçucu yağların ve bileşenlerini kullanmaları durumunda, akar toksisitesi ve hedef tür olan bal arıları için yeterli düzeyde güvenilirlik düzeylerini belirlemek için, arı kolonilerinde test edilmeden önce laboratuvar koşullarında test edilmesini önerilmektedir (Imdorf ve ark., 2006). Timolün akarisidal etkinliğin yanında hedef hayvan türü olan bal arılarının güvenliği bakımından laboratuvar da doz-yanıt ilişkisi ve uygulama süresinin incelendiği çalışmalarda; topikal yolla uygulandığında *V. destructor* için ÖD<sub>50</sub> değerinin 56,1 µg, yetişkin işçi arı için 210,3 µg, arı larvası için 150,7 µg ÖD<sub>50</sub> değerleri tespit edildiği (Gashoutl ve Guzman, 2009) solunum yoluyla 5-15 µg/L kovan içi hava konsantrasyonunda 72 saatlik maruziyet sonucu iyi bir akarisidal etki (>

%80) ve düşük arı toksisitesi (< %20) için olduğu bildirilmektedir (Imdorf ve ark., 2006).

Arılar üzerindeki olumsuz etkileri değerlendirildiğinde; yüksek miktarda süblimleşmeye neden olan çevre sıcaklıklarında huzursuzluk, kovana besin taşıma oranında azalma, erkek arılarda spermatozoon düzeyinin azalması ve koloni kaybına varan hasarlara yol açmakta, düşük seviyede salımında ise yeterli akarısidal etkinlik şekillenememektedir (Anon, 2001; Garrido, 2018 ve Thielka, 2018). Avrupa İlaç Ajansı tarafından varooosis mücadelesi ile ilgili yapılacak uygulamaların > 5 °C üzeri sıcaklıklarda sürdürülmesi gerektiği (Anon, 2021a), timol etkin maddesi içeren ticari akarısidal ilaçların prospektüslerinde ise yüksek akarısidal etkinlik elde edebilmek adına çevre sıcaklığının 15 °C üzeri olduğu dönemlerde uygulama yapılabileceği, daha düşük çevre sıcaklıklarında kolonilerde kış salkımı oluşması nedeniyle yapılacak uygulamanın ana arı ölümüne sebep olabileceği (Anon, 2018a), çevre sıcaklığı 30 °C'yi (Anon, 2014a ve Anon, 2020a) aştığı durumlarda arılarda ajitasyon, kaçışma (Anon, 2018a), kuluçka ve yetişkin arılarda ölüm oranı artışına (Anon, 2014a) sebep olabileceği için bu zamanlarda uygulama yapılmaması gerektiği belirtilmektedir. Timol içerikli bir ilacın kolonilere uygulanması sırasında arıların ürüne gösterdikleri toleransın önerilen dozlarda kullanımda iyi olduğu ancak koloninin huzursuzluk oluşumunu engellemek için ürünün temas yüzeyinin artırılmaması gerektiği belirtilmektedir (Trouiller, 2004).

Timolün saf toz haliyle veya vermikülit içerisinde kolonilere uygulandığında akarısidal etkinliğinin çevre sıcaklığı ile pozitif yönde ve nem ile negatif yönde korelasyon gösterdiği bildirilmektedir (Emsen ve ark., 2011)

Saf timol ile farklı miktar, farklı uygulama süresi, farklı kovan türleri, kovan içerisinde farklı uygulama yeri ve yıl içerisinde farklı zamanlarda yapılan

varroosis mücadelesi çalışmalarında ortalama etkinliklerin %66-98 arasında değiştiği, çerçevelerin üzerine ve özellikle petri kutusu içerisinde timol yerleştirilerek yapılan uygulamalarda akarisidal etkinliğin daha fazla olduğu, porlu seramik taşıyıcı ile oluşturulan içeriğinde %76 oranında timol bulunan ticari preparat ile yapılan çalışmalarda %66,4-99,5 aralığında akarisidal etkinlik şekillendiği bildirilmektedir (Imdorf ve ark., 1999).

Varroosis mücadelesi için ruhsatlı timol içerikli farklı formlardaki üç ilaçla İtalya ve Almanya'nın farklı bölgelerinde yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda, iki ilacın tüm bölgelerde yüksek etkinlik sergilediği sadece bir ilacın soğuk iklimli bölgelerde çevre sıcaklıklarındaki değişimlerden daha fazla etkilenecek daha az buharlaşma sonucu düşük etkinlik gösterdiği bildirildi (Garrido, 2018). Varroosis mücadelesi için ruhsatlı jel formunda 50 g (%25 timol) bir ilaçla 2 haftalık aralıklarla art arda 2 kez yapılan çalışmalarda farklı bölge, zaman ve çevre sıcaklıklarında, akarisidal etkinliğin %74-99 aralığında değişim gösterdiği, arıların ürüne gösterdikleri toleransın önerilen dozlarda kullanımda iyi olduğu ancak koloninin huzursuzluk oluşumunu engellemek için ürünün temas yüzeyinin artırılmaması gerektiği vurgulanmaktadır (Trouiller, 2004).

Hiçbir ilaç kullanılmadan sadece polen tuzaklı kovan kullanımının, kolonilerdeki varroosis enfestasyonu düzeyini azaltmada tek başına yüksek bir etkinliğe sahip olmadığı bildirilmekte, yüksek akarisidal etkinlik için diğer yöntemlerle birlikte uygulanması önerilmektedir (Sönmez, 2010).

Avrupa İlaç Ajansı tarafından varroosis mücadelesinde kullanılan kimyasalların akarisidal etkinliğin değerlendirilmesinde; sentetik maddeler için tercihen %95 veya daha yüksek bir düzeyde, diğer sentetik olmayan maddeler için %90 veya daha yüksek düzeylerdeki etkinliğin direnç indüksiyonu riskini azaltmaya yardımcı olacağı bildirilmektedir (Anon, 2021a).

Kalıntı bakımından değerlendirildiğinde; AB'de timol, grup II toksik olmayan bir veteriner ilacı olarak sınıflandırılmaktadır ve maksimum kalıntı limiti (MKL) gerektirmediği bildirilmektedir (Anon, 2018c; Mutinelli, 2003 ve Mutinelli, 2016). İsviçre’de, balda timolün tat kalıntısına sebep olan için 1,1 mg/kg eşiğini aşmaması için 0,8 mg/kg limit bulunmaktadır (Anon, 2001). Varroosis mücadelesi amacıyla timol etkin maddesi saf halde ya da farklı yardımcı maddelerden oluşturulan formülasyonlar halinde genellikle kovan çerçeveleri üst kısmına konulmaktadır (Imdorf ve ark., 1999). Timol içerikli farklı iki veteriner tıbbi ürünün kolonilere uygulanmasının ardından iki haftalık süreç içerisinde arılar tarafından yaklaşık %95’inin uygulama alanından uzaklaştırıldığı ve bal ile bal mumunda timol için tat kalıntı limiti olan 0,8 mg/kg düzeylerinin aşıldığı, timolün lipofilik yapısı nedeni ile baldan ziyade bal mumunda birikmeye daha yatkın olduğu bildirilmektedir (Bogdanov ve ark., 1998 ve Floris ve ark., 2004). Benzer bir çalışmada timol içerikli bir ilacın kolonilere uygulanmasının ardından biyolojik kompartımanlarda sırasıyla 368 ng/larva, 349 ng/prepupa, 634 ng/pupa, 1767 ng/erişkin arı düzeylerinde, biyolojik olmayan kompartımanlarda sırasıyla 1034 µg/kg bal, 1576 µg/kg bal mumu, 1021 µg/kg polen düzeylerinde tespit edildiği, sağaltımdan üç ay sonrası yapılan kontrollerde biyolojik kompartımanlardaki timol varlığının erişkin arılarda %69, larva, prepupa ve pupada %90 üzerinde azaldığı, bal mumu ve balda ise sırasıyla %17 ve %15 düzeyinde azaldığı ve kalıcılığının yüksek düzeyde olduğu bildirilmektedir (Sanchez ve ark., 2021).

Timolün maruziyet yolunu ve uygulanacak dozu kontrol etmek kapsamında literatürde elektrikli buharlaştırıcılar ile timol etkin maddesinin kaynağı olan kekik yağının sürekli olarak buharlaştırmak için tasarlanan enerji bağımlı bir sistemle uygulandığında yüksek düzeyde (%97), çözücüler içinde seyreltilen kekik yağını hızlı bir şekilde buharlaştırmak için tasarlanan pedler yardımıyla uygulandığında düşük seviyede akar kontrolü oranı (%58) gözlemlendiği, her iki sağaltım şeklinde kovanlardaki arı mortalite değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadığı, kullanılan *Varroa* öldürücü kimyasalların etkinliğinin, dağıtım sistemlerine yüksek oranda bağlı olduğu, kontrollü ve

sürekli buharlaşma-salım sağlayan sistemlerinin varroosis ile mücadelede daha etkin olduğu, mikrokapsülleme yoluyla uçucu yağların performansının artırılabilceğı, aynı zamanda uçuculuğı, suda yetersiz çözünme ve oksitlenme yeteneğı ile ilgili olumsuz etkilerin de azaltılabileceğı, bu bağlamda çalışmalarının, bal arısı kolonilerinde gelecekteki entegre akar mücadelesi uygulamalarına iyi bir alternatif sunduğunu bildirilmektedir (Ruffinengo ve ark. (2014).

Moretti ve ark. (2002), jelatin kullanarak, farklı kimyasal bileşenlere sahip olan *Rosmarinus officinalis* ve *Thymus herba-barona* uçucu yağları ile yüksek mikrokapsülleme verimleri elde ettiklerini, çalışmalarının sonunda daha az miktarlarda pestisit belirlirli bir zaman aralığında daha etkin kullanılmasına izin veren KSS'nin, uygulama kolaylığı sağlaması ve çevresel hasarı en aza indirmek bakımından iyi bir seçenek oluşturduğunu belirtmektedirler.

Timol gibi biyopestisitler bakımından, ideal bir KSS'nin; uygulama alanında aktif maddenin yavaş ve sürekli olarak salımına izin vermesi, salımın sağaltım penceresinde kalacak şekilde salım gerçekleşmesi, bir ilk hızlı salım ile dozun sağaltım penceresine girişı ve ardından uzun ve sabit bir salım hızı ile bu konsantrasyonun ihtiyaç duyulan süre boyunca herhangi bir ek uygulama gerekmeden sürdürülmesi temel özelliklerine sahip olması gerektiğı bildirilmektedir (Maes ve ark., 2019).

Timolün kapsül boyutuna göre kapsülasyon-enkapsülasyon ( $> 1 \text{ mm}$ ), mikrokapsülasyon-mikroenkapsülasyon ( $1-1000 \text{ }\mu\text{m}$ ), nanokapsülasyon-nanoenkapsülasyon ( $< 1000 \text{ nm}$ ) olarak adlandırılan teknikler ile hem doğal hem de sentetik polimerler kullanılarak kapsül içeriğine hapsedildiğı KSS'nin oluşturulduğı bildirilmektedir (Bhalereo ve Wang, 2018; Kaur ve ark., 2018 ve Maes ve ark., 2019).

Çekirdek materyali olan timol etkin maddesi ile farklı morfolojide KSS oluşturmak, kabuk materyali olan polimerleri çekirdek materyaline adapte ederek çeşitli boyutlara, kabuk kalınlığına ve geçirgenliğe sahip partiküller oluşturmak, böylece aktif maddenin salım oranını ayarlamak adına kimyasal yöntemler, fizikokimyasal yöntemler ve fizikomekanik yöntemler kullanıldığı (Bhalereo ve Wang, 2018), kapsüllenmede biyobozunur polimerler olan ksantan sakızı, poli vinil alkol (PVA), jelatin, nişasta, sodyum aljinat ve etil selüloz yaygın olarak kullanıldığı (Bhalereo ve Wang, 2018 ve Kim, 2004) bildirilmektedir.

KSS tasarlanırken hedeflenen etkinlik bakımından salımın gerçekleştirileceği ortam, salımın tipi-hızı-süresi, hedef tür dışı canlılar bakımından sistemin biyoyumluluğu, seçilecek hazırlama yönteminin, kabuk materyali olan polimerler ve yöntemde kullanılan diğer kimyasallar değerlendirilmesi gereken temel konular olup, kullanılan teknik ve polimerlere bağlı olarak farklı düzeyde verimlerle timol kapsüllemesi ve salımı gerçekleştirilebildiği (Bhalereo ve Wang, 2018), etkin madde salımının istenilen dozda yine istenilen süre boyunca devam edebilmesi için, sisteme yeterli düzeyde etkin madde yüklenmesi yanında istenmeyen dış etkilere karşı uygulama alanında yeterli süre kalabilmesi gerektiği, istenilen amaca uygun KSS geliştirilebilmesi için ayrıca karakterizasyon, morfolojik yapı, *in vitro* salım çalışmaları yapıldığı (Moretti ve ark. 2002; Souza ve ark., 2014 ve Zhu ve ark., 2019), varooosis mücadelesinde kullanıma yönelik geliştirilen ilaçların farmasötik kalite ve stabilite açısından belirli özelliklere sahip olması gerektiği görülmektedir (Anon, 2021d ve Anon, 2021e).

Hidrojeller dış çevrede meydana gelen değişimlere bağlı olarak tekrar eden şişme-büzüşme davranışı gösterebilirler. Şişme, polimerik ağ yapılarının karakteristik bir özelliğidir. Çapraz bağlanma miktarına bağlı olarak polimerik ağlar çözünmeden çok yüksek miktarda sıvı absorplayabilirler. Şişme testinde, hidrojinin absorbe ettiği suyun bir kısmı, polimer yapıdaki ilaçlar için difüzyon

yolları sağlaması nedeniyle salım kinetiğinin belirlenmesi açısından önemli bir testtir. Bazen şişme testinde hidrojel belirli bir noktadan sonra aşırı şişme özelliği gösterip sonrasında tamamen dağılarak tekrar eden şişme-büzüşme davranışı sergileyen hidrojel yapısını kaybedebilir (Özgündüz, 2006).

KSS'nde gerçekleştirilen bir diğer test olan etkin madde yükleme kapasitesinin belirlenmesi, hidrojel sistemine sağaltım için gereken etkin madde yüklenebilmesi ve uygulama alanında yapısını dış etkenlere karşı sağaltım süresi boyunca koruması açısından önemlidir. Farklı polimer ve tekniklerle yapılan matriks tipindeki KSS'nde timol yükleme oranlarının %20 ile %50, kapsül boyutlarının 10- 5000 µm düzeylerinde olduğu bildirilmektedir (Bhalereo ve Wang, 2018).

KSS'nin karakterizasyon incelemelerinde FT-IR spektroskopisi yaygın olarak kullanılmaktadır. Jelatin ile glutaraldehit kullanılarak sentezlenen hidrojellerde yapıdaki çapraz bağlama reaksiyonunun, çoğunlukla jelatin polimeri içindeki birincil amin grupları (N-H) bölgesinde meydana gelmektedir (You ve ark., 2016). Bu kimyasal reaksiyon sonucu jelatinin amino grupları ile glutaraldehitin aldehit grupları arasındaki aldimin bağı (CH=N) şekillenmekte ve aldimin gruplarının karakteristik absorpsiyonu FT-IR spektroskopide 1450 cm<sup>-1</sup>'de ortaya çıkmaktadır (Korkmaz ve ark., 2014).

KSS'nin morfolojisi ve yüzey topografisinin belirlenmesi için taramalı elektron mikroskobu ve ışık mikroskobu kullanılmaktadır (Kang ve ark.,1999 ve Imani ve ark., 2013). Jelatinin glutaraldehit ile çapraz bağlanmasıyla hazırlanan hidrojellere farklı donma sıcaklığı uygulandığında farklı boyutlarda gözenekli yapılar elde edildiği, - 20 °C sıcaklıkta dondurma ve sonrasında kurutma işlemi uygulanan hidrojeller kesitlerinde gözenek çapının 250 ±120µm, mekanik olarak zayıf ve kırılgan yapıya olduğu, iç yapının üç boyutlu olduğu ve gözenek duvarlarının ince olduğu bildirilmektedir (Kang ve ark.,1999).

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, ilaç endüstrisinde etkin ve yardımcı maddelerin kalitatif ve kantitatif ölçümlerinde, KSS geliştirme aşamalarında (Ramos ve ark., 2014 ve Ramos ve ark., 2020) ve hava ortamında (Imdorf ve ark., 1994 ; Imdorf ve ark., 1995; Rushworth ve ark., 2014 ve Xie ve ark., 2019), bal ve bal mumunda (Bogdanov ve ark., 1998 ve Martel ve Zeggane, 2002) timolün miktar tayini için kullanıldığı, asetonitril gibi organik çözücü ve su karışımından oluşan mobil fazların ve çözücülerin kullanıldığı, C18 ve 250 x 4,6 mm 5 mikron çap özelliğindeki kolonlardan geçirilen mobil faz içerisindeki etkin maddenin UV veya DAD dedektörde 225-278 nm aralığındaki dalga boylarında oluşturduğu absorbans ölçümleriyle yapıldığı, ayrıca yapılan ölçümlerin kesin ve tekrarlanabilir olabilmesi adına kullanılacak analitik metodun geçerli kılma çalışmalarının gerçekleştirildiği görülmektedir (Angelo ve ark., 2016; Aybastier ve Demir 2017; Dedić ve ark., 2018; Hajimehdiipoor ve ark., 2010; Louchard ve ark., 2017; Ramos ve ark., 2014 ve Rushworth ve ark., 2014).

*In vitro* testler, ilaçların popülasyonlarda kullanmaya geçmeden önce özelliklerini araştırmak ve geliştirmek amacıyla yoğun olarak kullanılan yöntemlerdir. *In vitro* testler daha düşük maliyetlerle ve daha kısa sürelerde, non invaziv ve basit tekniklerle gerçekleştirilebilmeleri yanında, *in vivo* testler için ön görüsel değer taşıma ve hatta belirli koşullarda onların yerini tutabilme özelliklerine sahiptir (Kayaalp, 2007). Laboratuvar koşullarında uçucu bileşenlerinin hava konsantrasyonları ile bunların akarlar ve arılar üzerindeki toksik etkileri arasındaki doz-yanıt ilişkisini belirlemek için gerçekleştirilen bir çalışmada timolle yapılan 72 saatlik test sırasında iyi bir akarisidal etkisi (> %80) ve düşük arı toksisitesi (< %20) için hava konsantrasyon aralığı 5-15 µg/L olarak bildirilmekte, uçucu yağların ve bileşenlerinin kullanmaları durumunda, akar toksisitesi ve hedef tür olan bal arıları için yeterli düzeyde güvenilirlik düzeylerini belirlemek için, arı kolonilerinde test edilmeden önce laboratuvar koşullarında test edilmesi önerilmektedir (Imdorf ve ark., 2006).

Akarisidal amaçla timolün *in vivo* ortamda kolonilere uygulaması sonrası farmakolojik ve toksikolojik etkileri üzerine; sıcaklık, nem ve kovan ventilasyonu faktörleri (Emsen ve ark., 2011; Fragkou ve Stevenson, 2012; Meikle ve ark., 2017; Toledo ve Nogueira-Couto 1999 ve Southwick ve Moritz, 1987), kolonilerdeki biyolojik ve biyolojik olmayan kompartımanların varlığı, nitelik ve niceliği ile biyolojik kompartımanlardaki beslenme, üreme gibi dinamik süreçler ve çevresel koşullar etkili olabilmektedir (Bogdanov ve ark., 1998; Floris ve ark., 2004; Gashoutl ve Guzman-Novoa, 2009; Martel ve Zeggane 2002 ve Sanchez ve ark., 2021).

Rezervuar ve matriks KSS'nde salım hızı genel olarak sıfır derece ve birinci derece kinetiğine göre gerçekleşmektedir. Sıfır derece kinetiğinde, sağaltım penceresinde sabit bir ilaç salım hızı oluşurken, birinci derece kinetiğinde azalan oranda ilaç salım hızı gözlenir (Chen ve ark., 2018).

Literatürde timolün başarı ile KSS'ne uygulanabildiği (Ayala-Zavala ve ark., 2010; Kaur ve ark., 2018; Martins ve ark., 2012 ve Zamani ve ark., 2015) ayrıca çoğunlukla sıvı ortama salım gerçekleştirildiği görülmektedir. Hava ortamına salım ile ilgili, timolün antibakteriyel etkisinden faydalanılarak gıdaların raf ömrünün uzatılması amaçlı ambalaj materyalleri geliştirilmesinde (Liu, 2016) KSS çalışmaları da bulunmaktadır. Ancak literatürde timolün biyoyumlu olduğu bildirilen polimerler ile oluşturulan KSS'nin varroosis mücadelesinde kovan içi hava ortamına salımı yoluyla kullanımı, sistemin oluşturduğu akarisidal etkinlik, hedef tür tolerans düzeyi ve bal ile bal mumunda timol kalıntısı bakımından mevcut timol içerikli ilaçlar ile karşılaştırmalı çalışmalara rastlanılmadı.

Bu çalışmada: İlk aşama hidrojel tekniği ile biyoyumlu olduğu bildirilen jelatin, Na-Aljinat ve CMC polimerleri ve glutaraldehit, FeCl<sub>3</sub> ve CaCl<sub>2</sub> çapraz bağlayıcılarının farklı oranlarda bileşimiyle, timol yükleme testleri için yapı

görünüm ve sağlamlık ile yine sağlamlığını koruyarak en üst düzeyde şişme sağlayan en az iki alternatif hidrojel sentezlenmesi amaçlandı. İkinci aşamada seçilen hidrojellere saf ve çözünmüş halde timol yükleme çalışmalarının gerçekleştirilmesi, yapı görünüm ve sağlamlık ile yine sağlamlığını koruyarak en üst düzeyde timol yüklenebilen hidrojin belirlenmesi amaçlandı. Üçüncü aşamada seçilen hidrojin karakterizasyonu, morfolojisi, farmasötik kalite özelliklerinin incelenmesi, *in vitro* salım tipi ve düzeyinin belirlenmesi, amaçlandı. Dördüncü aşamada *in vivo* ortamda farklı miktarda timol yüklü iki hidrojin akarisidal etkinlik ve hedef tür tolerans düzeylerinin araştırılması, referans timol ilacı ile yapılacak akarisidal etkinlik ve hedef tür tolerans düzeyi karşılaştırma çalışması için en uygun hidrojel dozunun belirlenmesi amaçlandı. Beşinci aşamada *in vivo* ortamda referans timol ilacı ile kontrollü salım sistemi olarak geliştirilen hidrojel arasında akarisidal etkinlik, hedef tür tolerans düzeyi, bal ve bal mumunda timol kalıntı düzeyleri bakımından karşılaştırmalar yaparak olası fark ve düzeyinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmanın birinci aşamasında; polimerler ve çapraz bağlayıcı kimyasalların farklı oranlarda bileşiminden oluşan 54 farklı hidrojin her birinden beşer seri olmak üzere toplamda 270 hidrojel üretildi. Yapı görünümü-sağlamlık ve şişme testi bulguları açısından yapılan değerlendirmede, tüm jelatin hidrojellerin dağılma olmadan ve ortalama %350 düzeyinde 48 saatlik şişme testini tamamladığı tespit edildi. En yüksek düzeyde şişme özelliği gösteren ve sağlam yapı ve homojen görünüme sahip iki adet jelatin hidroجلي tespit edildi. Na-Aljinat hidrojelleri 48 saatlik şişme testini dağılma sergilemeden tamamladığı tespit edildi.  $\text{CaCl}_2$  ile ve  $\text{FeCl}_3$  ile çapraz bağlanan hidrojellerde ortalama şişme %150 düzeyinde gözlemlendi. CMC hidrojelleri ( $\text{FeCl}_3$ ) 48 saatlik şişme testini dağılma sergilemeden tamamladı.  $\text{CaCl}_2$  çapraz bağlayıcısı ile üretilen hidrojel ise tamamlayamadı.  $\text{FeCl}_3$  ile çapraz bağlanan hidrojellerde ortalama şişme %150 düzeyinde gözlemlendi. Jelatin polimeri ile % şişme değerleri, sağlamlık ve yapı-homojen görünüm özellikleri bakımından Na-Aljinat ve CMC hidrojellerine göre daha verimli ve istikrarlı hidrojeller üretildiği belirlendi.

Bulgular Na-Aljinat ve CMC polimerleri ile KSS geliştirme için gereken farklı özelliklere sahip yeterli sayıda alternatif hidrojel oluşturulamadığını göstermektedir. Bu sebeple iki adet jelatin hidrojel ile timol yüklenebilme çalışmasına geçilmesine karar verildi. Na-Aljinat ile ve  $\text{CaCl}_2$  ve CMC ile  $\text{FeCl}_3$ 'ün farklı konsantrasyon ve sürelerde çapraz bağlayıcısı uygulanması sonucu % şişme testi değerleri bakımından birbirine yakın sonuçlar ortaya çıkması muhtemelen her iki çapraz bağlayıcının en düşük konsantrasyonda ve en kısa sürede maksimum bağlanma gerçekleştirmesi nedeni olup benzer özellikte hidrojeller üretildiğini göstermekte, diğer yandan CMC ile  $\text{CaCl}_2$ 'ün çapraz bağlayıcısının farklı konsantrasyonları ve farklı çapraz bağlanma süreleri uygulanmasına rağmen disklerin dağılmaya uğrayarak şişme testini tamamlayamaması, muhtemelen  $\text{CaCl}_2$  çapraz bağlayıcısının en yüksek konsantrasyonda ve en uzun sürede dahi yeterli CMC polimeri için yeterli çapraz bağlanma sağlamaması nedenlidir.

Çalışmanın ikinci aşamasında; seçilen jelatin hidrojellere timol yükleme çalışması kapsamında saf halde ve ayçiçek yağında çözünmüş halde timol etkin maddesi yüklemesi yapıldıktan sonra ölçülen yüklenebilme değerleri ortalama %25 olduğu, bu açıdan literatürle (Bhalereo ve Wang, 2018) uyumlu sonuçlar elde edildiği belirlendi. Yapı görünümü - sağlamlık, yükleme verimi özellikleri bakımından ayçiçek yağında çözündürülmüş timol içeren jelatin hidrojel ile *in vitro* salım denemelerine geçilmesine karar verildi. Timol yüklenebilme çalışmasında saf timolün tüm hidrojel çeşitlerinde hidrojel kesitleri yüzeyinde tutulma eğilimi gösterdiği, timolün ayçiçek yağında çözünmüş haliyle gerçekleştirilen yükleme çalışmalarında saf timol ile gerçekleştirilen çalışmalara göre özellikle jelatin hidrojel yapılarına daha homojen dağılım sergilediği tespit edildi.

Çalışmanın üçüncü aşamasında; çapraz bağlanmamış jelatinin FT-IR spektrumunda  $3283\text{ cm}^{-1}$ 'de geniş bir pik vardır ve bu pik jelatin yapısındaki (N-H) pikidir. FT-IR spektrumunda  $3283\text{ cm}^{-1}$ 'de çapraz bağlanmamış jelatinin ve

Çapraz bağlı jelatinin birincil amin grubu bölgesindeki pikleri incelendiğinde, çapraz bağlanma reaksiyonu sonrası jelatinin birincil amin içeriğinin belirgin şekilde azaldığı, test hidrojelinin FT-IR spektrumlarına göre 2924 cm<sup>-1</sup> ve 2854 cm<sup>-1</sup>'de timolün karakteristik C-H bağı pikleri tespit edildi. Sonuç olarak oluşturulan test hidrojelinin timol içeriği ve glutaraldehit ile çapraz bağlanmasının FT-IR bulgularının literatür (Korkmaz ve ark., ve You ve ark., 2016) ile uyumlu olduğu tespit edildi. Hidrojel yapının morfolojisinin incelenmesi aşamasında dondurularak kurutulan ve etüvde kurutulan hidrojellerin mikroyapısı içerisinde yer alan gözenek boyutlarının plasebo ve test hidrojelleri için yapılan SEM ölçümleriyle sırasıyla 120,9-413 m ve 93,9-264,3 m olarak, ışık mikroskobu ile yapılan ölçümleriyle sırasıyla 568-963 m 514-948 m olarak tespit edildi ve bu açıdan literatürle (Bhalereo ve Wang, 2018) uyumlu sonuçlar elde edildiği belirlendi. Liyofilizasyon işleminin ve etüvde kurutmanın yüzey topografisi ve gözenekli yapıya olan muhtemel etkilerini karşılaştırıldığında liyofilizasyon öncesi düşük dondurma sıcaklığı uygulamasının literatürle uyumlu olarak, normal koşullarda kurutmaya göre gözeneklerin küçülmesine ve gözenek çeperlerinin kalınlaşmasına neden olduğu doğrulandı (Imani ve Ark. 2012). Dondurularak kurutulan plasebo ile test hidrojeli arasındaki gözenek boyutu ve i yapısındaki farklılıklar, muhtemelen dondurma işlemi sırasında yapıda yer alan timol kaynaklı ısı transfer hızlarındaki muhtemel farklılıklardan kaynaklanabilir ve plasebo hidrojelinde daha büyük buz kristalleri jelatin zincirlerini daha fazla genişletmeye ittiğinden, yapı tahrip olurken hidrojellerin gözenek boyutu artmış olabilir (Kang ve Ark., 1999). Ayrıca makroskobik düzeydeki bulgular açısından değerlendirildiğinde, - 20 C de dondurma işlemi ve ardından yapılan liyofilizasyon işlemi sonrası elde edilen hidrojellerin parçalanmaya müsait yapı sergilemesi literatür ile uyumludur (Kang ve Ark., 1999). Test hidrojelinin hacim/kütle tekdüzeliği (Anon, 2021d) ve içerik tek düzeliği (Anon, 2021e) kalitesi açısından yapılan analizler sonucu Avrupa Farmakopesi gerekliliklerine uyumlu olduğu ve test süresi olan altı aylık süreç içerisinde bu farmasötik kalite özellikleri açısından stabilitesini koruduğu belirlendi.

*In vitro* salım çalışmaları kapsamında; timol içeren hidrojel *in vivo* ortamdaki kolonilerde gerçekleştireceği salımın tipi ve düzeyini ön görmek için saf timol ve referans ilaç ile dört hafta süreli karşılaştırmalı salım denemeleri gerçekleştirilerek kovan içi havadaki timol konsantrasyonunun sağaltım penceresi açısından kontroller gerçekleştirildi. Gravimetrik ölçümlerde; çalışma kapsamında geliştirilen *in vitro* salım siteminde dört hafta süre sonunda 12,5 g saf timolden 5,28 g süblimleşme gerçekleştiği, 12,5 g saf timol içeren pozitif kontrol ilacından 4 hafta sonunda 2,69 g timol salımı gerçekleştiği, 12,5 g saf timol içeren hidrojelden 4 hafta sonunda 1,87 g süblimleşme gerçekleştiği belirlendi. HPLC-DAD ile yapılan ölçümlerde; süblimleşen saf timolün, yaklaşık %57 sinin (3,03 g) kovan çeperine adsorbe olduğu, %43'ünün (2,25 g) çözücü tuzaklarında tutulduğu, referans ilaçtan salınan timolün, %34'ünün (0,91 g) kovan çeperine adsorbe olduğu, %66'sının (1,77 g) çözücü tuzaklarında tutulduğu, hidrojelden süblimleşen timolün, %49'unun (0,91 g) kovan çeperine adsorbe olduğu, %51'inin (0,96 g) çözücü tuzaklarında tutulduğu tespit edildi. *in vitro* kümülatif salım konsantrasyon-salım grafikleri incelendiğinde; dört haftalık süre içerisinde saf timol ve referans ilaç grafiklerinin birinci derece salım kinetiği, hidrojel grafiğinin sıfırıncı kinetiği ile uyumlu salım tipi sergilediği belirlendi. Çalışma kapsamında üretilen ve *in vitro* ortamda salım denemesi gerçekleştirilen timol yüklü hidrojel ve sıfırıncı derece salım kinetiği sergiledi. Sergilediği yavaş, sürekli ve sabit salım bakımından ideal bir timol KSS'i için belirtilen gerekliliklere uyumlu olduğu belirlendi.

Eşit deneysel şartlar, eşit süreler ve eşit miktarda etkin madde içeren saf timol, pozitif kontrol ilacı (referans ilaç) ve hidrojel için *in vitro* koşullarda gravimetrik ölçümler sonucu, farklı düzeylerde süblimleşme ve salım gerçekleştiği ve bu doğrultuda üç farklı uygulama için elde edilen kovan içi bir litre havadaki timol konsantrasyonları dikkate alındığında; Imdorf ve ark. (1995), tarafından belirtilen 5-15 µg/L hava konsantrasyonlarındaki sağaltım penceresinin üzerine çıktığı gözlemlendi. Hidrojel için yapılan ölçümlerde salımın saf timol ve referans ilaca göre daha az düzeyde gerçekleştiği gözlemlendi. Her üç uygulamada da sağaltım penceresi üzerinde izlenen konsantrasyonlar

muhtemelen antibakteriyellerin *in vitro* ortamda elde edilen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin *in vivo* ortamda elde edilebilmesi için uygulanan ilaç miktarı veya titresinin 1 ila 10 kat artırıldığı örneğinde olduğu gibi (Kaya, 2007) *in vivo* ortamda bulunan ve *in vivo* ortamda oluşacak konsantrasyonun azalmasına yol açan ancak *in vitro* ortamda bulunmayan ve/veya oluşturulamayan ilacın farmakokinetiğinde önemli dağılım hacmi (kompartımanların nitelik ve niceliği) gibi faktörlerden kaynaklanmaktadır. Hidrojel için *in vitro* ortamda ölçülen kovan içi bir litre havadaki timol konsantrasyonları 1/5 ve 1/10 oranlarında ölçeklendirilerek teorik olarak *in vivo* ortamda oluşabilecek konsantrasyonlar için grafikler oluşturuldu. Elde edilen grafiklerde her iki ölçeklendirme için teorik olarak sağaltım penceresine uyumlu bir salım şekillenmektedir. Ön görülen konsantrasyonların, antiparaziter ilaçların *in vivo* ortamda uygulanacak miktarlarının belirlenmesi için önerilen doz titrasyon ve doz doğrulama çalışmaları (Anon, 2021a) ile bal arısı kolonilerinde akarisidal etkinlik ve hedef tür toleransı bakımından klinik olarak doğrulanmasına karar verildi.

Çalışmanın dördüncü aşaması olan doz titrasyon ve doz doğrulama çalışması kapsamında; çalışma öncesi varroosis, noseiosis ve pestisit maruziyet, kontrolleri yapılan kolonilerden rastgele seçimle, polen tuzaklı 5 koloni negatif kontrol grubu olarak belirlendi. 12,5 g timol içeren hidrojeller uygulanan polen tuzaklı 5 koloni test-1 grubu olarak belirlendi. 25 g timol içeren hidrojeller uygulanan polen tuzaklı 5 koloni test-2 grubu olarak belirlendi. Çalışmanın sürdürüldüğü dört haftalık zaman diliminde gece ve gündüz için ortalama çevre ve kovan içi sıcaklıkların 5 °C üzerinde ve 30 °C altında olduğu tespit edildi. Bu bakımdan çalışma süresince ilgili kılavuz (Anon, 2021a) ve timol içerikli ilaçların prospektüslerinde (Anon, 2014a; Anon, 2018a ve Anon, 2020a) belirtilen şartlara uygun çevre koşullarında çalışma gerçekleştirildi. Bu sebeple timol kullanılan kolonilerde yüksek sıcaklık (Anon, 2014a ve Anon, 2020a) ya da düşük sıcaklık (Anon, 2018a) durumlarında oluşabilecek herhangi bir olumsuzluk gözlenmedi. Dört hafta süren çalışma sonunda tüm sağaltım

grupları arasında akarisidal etkinlik düzeyi bakımından anlamlı düzeyde ( $p < 0,05$ ) fark tespit edildi. Akarisidal etkinlik oranları; negatif kontrol grubu için %27,6 düzeyinde, test-1 grubu için %56,6 ve test-2 grubu için %76,6 olarak hesaplandı. Hidrojel uygulamaları sonucu elde edilen akarisidal etkinlik düzeyleri, saf timol (Imdorf ve ark., 1999) ve timol içerikli ilaç (Trouiller, 2004) uygulamaları ile elde edilen akarisidal etkinlik düzeyleri karşılaştırdığında test-2 grubu için literatür ile uyumlu sonuçlar elde edildiği, test-1 grubu için literatüre göre düşük seviyede etkinlik şekillendiği görülmektedir. Test-1 grubu için düşük seviyede akarisidal etkinlik elde edilmesi, muhtemelen zayıf *in vitro-in vivo* korelasyon nedeni kovan içi hava timol konsantrasyonun düşük düzeylerde kalmasıdır. Sadece polen tuzağı bulunan negatif kontrol grubu kolonilerinde elde edilen %27,6 düzeyindeki akarisidal etkinliğin varooosis mücadelesinde enfestasyonu ekonomik zarar eşiğinin altına indirmede yeterli olmadığı, kolonideki akar popülasyonunun artmaya devam ettiği, bu kapsamda polen tuzağının diğer yöntemlerle birlikte kullanılması gerektiği teyit edilmiştir. Hedef tür hayvan tolerans düzeyi ile ilgili veriler değerlendirildiğinde: Test-1 grubu ile test-2 grubu arasında anlamlı düzeyde ( $p < 0,05$ ) fark tespit edilemedi. Farklı miktarlarda timol içeren hidrojellerin uygulanmasına rağmen iki uygulamanın arılar tarafından benzer düzeyde tolere edilmesi, muhtemelen kovan içi hava timol konsantrasyonlarının sağaltım penceresi dışında gerçekleşmemesi nedenlidir.

Çalışmanın beşinci aşaması olan akarisidal etkinlik ve hedef tür tolerans düzeyi çalışması kapsamında; doz titrasyon ve doz doğrulama çalışmasında kullanılan kolonilerden rastgele seçimle polen tuzaklı 5 koloni negatif kontrol grubu olarak belirlendi. 2 hafta ara ile 12,5 g timol içeren referans ilaç uygulanan polen tuzaklı 5 koloni pozitif kontrol grubu olarak belirlendi. 25 g timol içeren hidrojeller uygulanan polen tuzaklı 5 koloni test grubu olarak belirlendi. Çalışmanın sürdürüldüğü dört haftalık zaman diliminde gece ve gündüz için ortalama çevre ve kovan içi sıcaklıkların 5 °C üzerinde ve 30 °C altında olduğu tespit edildi. Bu bakımdan çalışma süresince ilgili kılavuz (Anon, 2021a) ve timol içerikli ilaçların prospektüslerinde (Anon, 2014a; Anon, 2018a ve Anon,

2020a) belirtilen şartlara uygun çevre koşullarında çalışma gerçekleştirildi. Bu sebeple timol kullanılan kolonilerde yüksek sıcaklık (Anon, 2014a ve Anon, 2020a) ya da düşük sıcaklık (Anon, 2018a) durumlarında oluşabilecek herhangi bir olumsuzluk gözlenmedi. Dört hafta süren çalışma sonunda akarisidal etkinlik oranları; pozitif kontrol grubu için %81,09 ve test grubu için %70,32 olarak hesaplandı. Tüm gruplar arasında akarisidal etkinlik düzeyi bakımından anlamlı düzeyde fark ( $p < 0,05$ ) tespit edildi. Test grubu ve pozitif kontrol grubundan elde edilen akarisidal etkinlik düzeyleri, (Imdorf ve ark., 1999, Trouiller, 2004) literatür ile uyumludur. 25 g timol içeren hidrojel uygulaması sonucu doz titrasyon ve doz doğrulama ve akarisadal etkinlik-hedef tür tolerans düzeyi çalışmalarında farklı akarisidal etkinlik düzeyleri elde edilmesi muhtemelen iki çalışma dönemindeki ortalama çevre sıcaklıkları arasındaki farktan kaynaklanmaktadır. Akarisidal etkinlik-hedef tür tolerans düzeyi çalışmasında sadece polen tuzağı bulunan negatif kontrol grubu için %21,93 düzeyinde akarisidal etkinlik tespit edilmiş olup, bu etki düzeyinin varooosis mücadelesinde enfestasyonu ekonomik zarar eşiğinin altına indirmede yeterli olmadığı, kolonideki akar popülasyonunun artmaya devam ettiği, bu kapsamda polen tuzağının diğer yöntemlerle birlikte kullanılması gerektiği teyit edilmiştir. Doz titrasyon ve doz doğrulama çalışması ile akarisidal etkinlik ve hedef tür tolerans çalışması kapsamında yapılan uygulamalar ve gerçekleşen akarisidal etkinlik verileri değerlendirildiğinde her iki çalışmada da akarisidal etkinlik ve hedef tür tolerans düzeyi bakımından anlamlı düzeyde fark oluşması, her iki grupta da kovan içi havaya salınan timolün solunum maruziyeti yanında muhtemelen pozitif kontrol ilacının kolonilerde uygulama alanından arılar tarafından iki haftalık süreçte büyük oranda uzaklaştırılması sırasında arılarda ve akarlarda temas yoluyla timol maruziyeti şekillenmesi nedenlidir. Buradan hareketle, iki farklı yolla maruziyetin gelişmesi özellikle timol gibi sağaltım indeksi dar olan ilaçların doz kontrolünde maruziyet yolu kontrolünün de hedef türler için önemli olduğu, mümkün olduğunca arıların temas maruziyetinin azaltılması ile gerektiği çıkarımı yapılabilir.

Ayrıca arıların pozitif kontrol ilacını kovanlardaki uygulama alanlarından taşınması nedeni sağaltıcı dozun sürdürülebilirliği için ek bir doz uygulamasının gerektiği tespit edildi (Anon, 2018a). Hidrojel yapısının uygulandığı kolonilerde dört haftalık sağaltım süresi içerisinde uygulama alanında bütünlüğünü koruduğu ve sağaltıcı dozun sürdürülebilirliği için ek bir doz uygulamasının gerektirmediği tespit edildi. Oluşturulan hidrojin ideal bir kontrollü salım sistemi için belirtilen (Maes ve ark., 2019), ihtiyaç duyulan süre boyunca herhangi bir ek uygulama gerekmeden sağaltımın sürdürülebilmesi özelliği bakımından literatür ile uyumlu olduğu değerlendirildi.

Bu çalışmada; akarisidal etkinlik ve hedef tür tolerans düzeyi çalışması sonrası kolonilerden alınan ve analiz edilen bal örneklerinde, negatif kontrol grubu ile test grubu arasında balda timol kalıntı düzeyi bakımından anlamlı düzeyde fark tespit edilemedi ( $p < 0,05$ ). Pozitif kontrol grubunun ise balda timol kalıntısı bakımından bu her iki gruptan anlamlı düzeyde yüksek kalıntı içerdiği ve timol tat kalıntısı limitinin (Anon, 2001) aşıldığı tespit edildi. Bu durum muhtemelen pozitif kontrol grubunda uygulanan ilacın arılar tarafından kovanlardaki uygulama alanlarından taşınması ve kovan kompartımanlarında kontrolsüz olarak büyük miktarlarda dağılması nedeni olup ilacın kontrolsüz bir şekilde uygulama alanından uzaklaştırılması arıcılık ürünleri ve çevrede kalıntı oluşturma potansiyeli barındırmaktadır. Analiz edilen bal mumu örneklerinde, pozitif kontrol grubu ile negatif kontrol grubu arasında timol kalıntı düzeyi bakımından anlamlı düzeyde fark tespit edildi ( $p < 0,05$ ). Negatif kontrol grubu ile test grubu arasında ve test grubu ile pozitif kontrol grubu arasında bal mumunda timol kalıntı düzeyi bakımından anlamlı düzeyde fark tespit edilemedi ( $p < 0,05$ ). Bal mumunda timol kalıntısı ile ilgili bir limit bildirimi olmamakla birlikte timolün lipofilik yapısı nedeni ile baldan ziyade bal mumunda birikmeye daha yatkın olduğu (Bogdanov ve ark., 1998 ve Floris ve ark., 2004) belirtilmektedir. Bu çalışmada pozitif kontrol ilacı uygulanan kolonilerden alınan bal mumu numunelerinde bal numunelerine oranla daha düşük timol kalıntısı tespit edildi. Bu durum muhtemelen pozitif kontrol ilacı uygulaması yapılan kolonilerde sağaltım döneminde nektar toplama faaliyetlerinin devam

etmesi ve ilacın uzaklaştırılması sırasında balın bal mumuna göre daha fazla kontamine olması nedenlidir.

Bu çalışmada timolün kalitatif ve kantitatif tayini için ihtiyaç duyulan KSS geliştirme aşamalarında (Ramos ve ark., 2014 ve Ramos ve ark., 2020), *in vitro* salım sistemindeki çalışmalarda (Rushworth ve ark., 2014), bal ve bal mumu kalıntı analizlerinde (Bogdanov ve ark., 1998 ve Martel ve Zeggane, 2002) literatürle uyumlu olarak yüksek basınçlı sıvı kromatografi ve diyot dizinli dedektör sistemiyle C18 ve 250 x 4,6 mm 5 mikron çap özelliğinde bir kolon ve asetonitril gibi organik çözücü ve su karışımından oluşan mobil fazların ve çözücülerin kullanıldığı bir analitik metot geliştirildi. Bal ve bal mumu gibi matrikslerden özütlemeye işlemleri için literatürde yer alan (Bogdanov ve ark., 1998; Martel ve Zeggane, 2002 ve Jamal ve ark., 2020) metotlar kullanıldı. Analitik metot ile yapılan ölçümlerin doğru ve kesin olmasının sürekli olarak sağlanabilmesi adına, uluslararası otoritelerce (Anon, 1996 ve Anon, 1998) veteriner tıbbi ürünlerdeki etkin maddelerin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi ile kantitatif tayini için belirlenen seçicilik, doğruluk, kesinlik, tespit limiti, kantitatif limit, doğrusalılık, aralık, sağlamlık ve sistem uygunluk parametreleri ve çözelti stabilitesi parametresi bakımından analitik metot geçerli kılındı.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, timolün biyoyumlu olduğu bildirilen polimerler ve hidrojel tekniği ile oluşturulan KSS'nin varroosis mücadelesinde kovan içi hava ortamına timol salımı yoluyla kullanımı, sistemin oluşturduğu akarisidal etkinlik, hedef tür arılarda tolerans düzeyleri ve bal ile bal mumunda timol kalıntı düzeyleri bakımından timol içerikli referans ilaçla karşılaştırılması, KSS ve mevcut ilaç formülasyonları ile yapılan uygulamalar arasında olası fark ve düzeyinin araştırılması amacıyla çalışmalar yapıldı.

Akarisidal etkinlik oranları; referans ilaç uygulamasında %81,09 ve kontrollü timol salım sistemi olarak geliştirilen hidrojel timol içeren hidrojel uygulamasında %70,32 olarak hesaplandı. Uygulamalar arasında akarisidal etkinlik düzeyi bakımından anlamlı düzeyde fark ( $p < 0,05$ ) tespit edildi. Referans ilaç uygulaması birim etkin maddeden elde edilen akarisidal etkinlik bakımında hidrojel uygulamasına göre daha yüksek etkinlik sergiledi. Her iki uygulamanın direnç indüksiyonunu engelleme açısından EMA kılavuzunda (Anon, 2021a) belirtilen değerlerin altında etkinlik sergilendiği belirlendi. Yüksek akarisidal etkinlik ve sağaltım için gereken ilaç miktarının azaltılması kapsamında farklı polimer, çapraz bağlayıcı ve çözücü-emülsifiye edici maddeler ve farklı üretim teknikleri ile daha fazla ideal bir KSS geliştirme çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Hedef tür hayvan tolerans düzeyi ile ilgili veriler değerlendirildiğinde: referans ilaç uygulaması ile hidrojel uygulaması arasında anlamlı düzeyde ( $p < 0,05$ ) fark tespit edildi. Negatif kontrol grubu ile test grubu arasında hedef tür tolerans düzeyi bakımından anlamlı düzeyde fark tespit edilemedi ( $p < 0,05$ ). Biyoyumlu ve biyobozunur olduğu bildirilen jelatin polimeri ile kontrollü timol salım sistemi olarak geliştirilen hidrolejin arı kolonilerine uygulanması ve arıların sisteme göstermiş oldukları tolerans düzeyi açısından başarılı elde

edildiği ve arı kolonilerinde uygulanacak ilaçların bileşiminde yer alan sentetik polimerlerin yerine biyouyumlu ve biyobozunur polimerlerin alternatif olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Balda timol kalıntısı bakımından referans ilaç uygulanan kolonilerin hidrojel uygulanan ve negatif kontrol grubu kolonilerinden anlamlı düzeyde yüksek kalıntı içerdiği ve timol tat kalıntısı limitinin (Anon, 2001) aşıldığı tespit edildi. Bal mumunda timol kalıntısı bakımından, referans ilaç uygulanan kolonilerin negatif kontrol kolonilerinden anlamlı düzeyde yüksek kalıntı içerdiği, negatif kontrol grubu ile test grubu arasında ve test grubu ile pozitif kontrol grubu arasında anlamlı düzeyde fark ( $p < 0,05$ ) olduğu belirlendi. Geliştirilen kontrollü salım sisteminin bal ve bal mumunda düşük düzeylerde timol kalıntısı oluşturması bakımından başarılı olduğu, kolonilere uygulanan ilaçların arılar tarafından uygulandığı yerden uzaklaştırılması sırasında kontrolsüz olarak arı ürünleri ve çevreye dağıldığı arıcılık ürünleri ve çevrede kalıntı ile antiparaziter direnç indüksiyonun açısından sorun oluşturduğu, etkin maddelerin daha kontrollü ve verimli kullanılması için kolonilere uygulanacak ilaçların geliştirme aşamasında bileşimde bulunan yardımcı maddelerin seçiminde bu durumda göz önünde bulundurulması gerektiği düşünülmektedir.

Çalışmada geliştirilmesi hedeflenen kontrollü timol salım sisteminin, ideal bir kontrollü salım sistemi için belirtilen (Maes ve ark., 2019) temel gereklilikler bakımından; ihtiyaç duyulan süre boyunca herhangi bir ek uygulama gerekmeden sağaltımın sürdürülebilmesi, yavaş, sürekli ve sabit salım gerçekleştirmesi ve sıfırıncı derece salım kinetiği sergilemesi özellikleri bakımından literatür ile uyumlu olduğu değerlendirildi.

İdeal bir kontrollü salım sistemi için belirtilen bir diğer gereklilik olan salımın sağaltım penceresi içerisinde sürdürülebilirliği bakımından

değerlendirildiğinde geliştirilen *in vitro* deney düzeninde gerçekleşen salım ile *in vivo* ortamda gerçekleşen salım arasında öngörülemeyen ve zayıf korelasyon olduğu, daha sağlıklı değerlendirmeler yapılabilmesi için *in vivo* ortamda salım düzeyi ölçüm çalışmalarına ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Gelecekte yapılacak çalışmalarda elde edilecek tecrübe ile kolonilere ilaç uygulaması sonrası farmakolojik ve toksikolojik yaşam döngülerinin ele alındığı, kovanların fiziki yapı özellikleri, kolonilerdeki biyolojik ve biyolojik olmayan kompartımanların varlığı, nitelik ve niceliği, biyolojik kompartımanlardaki beslenme, üreme gibi dinamik süreçler ve çevresel koşulların bir arada değerlendirilebileceği deney tasarımlarının geliştirilebileceği, *in vivo* koşullardaki bu farmakolojik-toksikolojik faktörlerin ele alındığı modellemelerin entegrasyonu ile *in vitro-in vivo* korelasyon yaklaşımlarının geliştirilmesinin arılarda kullanılan ilaçların araştırma geliştirme sürecine ivme kazandıracağı düşünülmektedir.

Varroosis enfestasyonu ile mücadelede için mevcut kimyasal maddeler ve biyoyumlu-biyobozunur olduğu bildirilen polimerler ile oluşturularak enerjiden bağımsız KSS'nin, etkin maddenin dış koşullara karşı korunması, arılar tarafından etkin maddenin koloni dışına taşınmasının engellenmesi, ek bir uygulama gerekmeden etkin maddenin sağaltım süresince sağaltım alanında kalması ile mücadelede sürdürülebilirliğin sağlanması, maruziyet yolunun kontrolü arılarda temas nedenli toksisite ve ayrıca arı ürünleri ve çevrede kimyasal madde kalıntılarının daha da sınırlandırılması bakımından çözüm potansiyeli barındırmaktadır.

KSS çalışmalarından elde edilecek tecrübe ve bilgi birikimiyle, gelecekte koloni sağlığı, gıda ve çevre güvenliği bakımından gereken ilaç miktarının en aza indirilmesini sağlayan yeni veteriner farmasötiklerin geliştirilebileceği ve mevcut farmasötik ürünlere fonksiyonel özellikler eklenerek katma değeri yüksek ürünler geliştirilebileceği düşünülmektedir.

## ÖZET

### Varroosis Mücadelesi İçin Kontrollü Timol Salım Sisteminin Geliştirilmesi ve Etkinliğinin Araştırılması

Varroosis; *Varroa destructor* adlı akarın, bal arısı kolonilerini istila ettiği, arıların hemolenfleriyle beslenerek çeşitli zararlar oluşturduğu bir enfestasyondur. Bu çalışmada; timol ve jelatin, Na-Aljinat ve karboksi metil selüloz polimerleri kullanılarak hidrojel tekniğiyle oluşturulan kontrollü salım sisteminin akarisidal etkinlik, hedef tür tolerans ve bal ile bal mumunda timol kalıntı düzeyleri bakımından timol içerikli referans ilaçla karşılaştırılması, olası fark ve düzeyinin araştırılması amaçlandı. Hidrojellerin şişme/bozunma davranışları ve timol yüklenebilme düzeyleri, karakterizasyonu ve morfolojisi hassas terazi, yüksek basınçlı sıvı kromatografi, fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi, taramalı elektron mikroskobu ve ışık mikroskobu kullanılarak belirlendi. Hidrojelin kovan içi hava ortamındaki salım tipi ve düzeyi incelemek için bir *in vitro* salım sistemi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografi kullanılarak bir analitik metod geliştirildi. *İn vivo* çalışmalar İstanbul İlinde bulunan bir arılıkta gerçekleştirildi. Bulgular %95 güven düzeyinde ( $\pm$  % 5 hata payı) yorumlandı. Akarisidal etkinlik, referans ilaç grubunda %81,09, hidrojel grubunda %70,32 ve negatif kontrol grubunda %21,9 olarak tespit edildi. Gruplar arasında anlamlı düzeyde fark ( $p < 0,05$ ) olduğu ve uygulamaların direnç indüksiyonunu engelleme açısından düşük düzeyde etkinlik sergilendiği belirlendi. Hedef tür tolerans düzeyi kapsamında dört haftalık sürede ölen ortalama arı sayıları, referans ilaç grubunda 297,4 adet, hidrojel grubunda 86,8 adet ve negatif kontrol grubunda 60,8 adet tespit edildi. Referans ilaç grubunda, negatif kontrol grubu ile hidrojel grubuna göre anlamlı düzeyde ( $p < 0,05$ ) yüksek arı ölümü tespit edildi. Balda ortalama timol kalıntısı, referans ilaç grubunda 5,498 mg/kg, hidrojel grubunda 0,168 mg/kg ve negatif kontrol grubunda 0,038 mg/kg düzeyinde tespit edildi. Referans ilaç grubunda, negatif kontrol grubu ile hidrojel uygulamasına göre anlamlı düzeyde ( $p < 0,05$ ) yüksek timol kalıntısı olduğu ve timol tat kalıntısı limitinin aşıldığı tespit edildi. Bal mumunda ortalama timol kalıntısı, referans ilaç grubunda 1,667 mg/kg, hidrojel grubunda 0,476 mg/kg, negatif kontrol grubunda 0,093 mg/kg düzeyinde tespit edildi. Referans ilaç grubunda bal mumunda timol kalıntısının negatif kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksek kalıntı içerdiği tespit edildi. Negatif kontrol grubu ile hidrojel grubu ve referans ilaç grubu ile hidrojel grubu arasında anlamlı düzeyde fark ( $p < 0,05$ ) tespit edilemedi. Sonuç olarak varroosis enfestasyonu ile mücadele için biyoyumlu-biyobozunur polimerleri kullanarak geliştirilen enerjiden bağımsız bu kontrollü salım sistemi; etkin maddenin dış koşullara karşı korunması ve arılar tarafından koloni dışına taşınmasının engellenmesi ile ek bir uygulama gerekmeden mücadelede sürdürülebilirliğin sağlanması, etkin madde maruziyet yolunun kontrolü yoluyla arılarda oluşan temas nedenli toksisitenin, arı ürünlerinde ve çevrede oluşacak kimyasal madde kalıntılarının sınırlandırılması yönleriyle önemli avantajlar sağlamaktadır.

**Anahtar Sözcükler:** Akarisidal etkinlik, Arı, Kontrollü Salım Sistemi, Timol, Varroosis.

## SUMMARY

### Development of Controlled Thymol Release System for Varroosis Struggle and Investigation of its Effectiveness

Varroosis; it is an infestation in which the mite named *Varroa destructor* invades honey bee colonies and causes various damages by feeding on the hemolymphs of bees. In this study; it was aimed to compare the controlled release system formed by hydrogel technique using thymol and gelatin, Na-Alginate and carboxy methyl cellulose polymers with the reference drug containing thymol in terms of acaricidal efficiency, target species tolerance and thymol residue levels in honey and beeswax, and to investigate the possible difference and level. The swelling/degradation behaviour and thymol loading levels, characterization and morphology of the hydrogels were determined using analytical balance, high pressure liquid chromatography, fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscope and light microscope. An *in vitro* release system was developed to study the release type, level and duration of the hydrogel in the hive air environment and an analytical method was developed using high pressure liquid chromatography. *In vivo* studies were carried out in an apiary located in Istanbul. The results were interpreted at the 95% confidence level ( $\pm 5\%$  margin of error). The acaricidal efficacy was 81,09% in the reference drug group, 70,32% in the hydrogel group, and 21,9% in the negative control group. It was determined that there was a significant difference ( $p < 0,05$ ) between the groups and that the applications showed a low level of effectiveness in preventing resistance induction. Within the scope of target species tolerance level, the average number of bees that died in a four-week period was 297,4 in the reference drug group, 86,8 in the hydrogel group and 60,8 in the negative control group. Significantly ( $p < 0,05$ ) higher bee mortality was detected in the reference drug group compared to the negative control group and the hydrogel group. The mean thymol residue in honey was 5,498 mg/kg in the reference drug group, 0,168 mg/kg in the hydrogel group and 0,038 mg/kg in the negative control group. It was determined that thymol residues were significantly higher ( $p < 0,05$ ) in the reference drug group compared to the negative control group and hydrogel application, and the thymol taste residue limit was exceeded. The mean thymol residue in beeswax was 1,667 mg/kg in the reference drug group, 0,476 mg/kg in the hydrogel group, and 0,093 mg/kg in the negative control group. It was determined that thymol residue in beeswax in the reference drug group contained significantly higher residues than the negative control group. There was no significant difference ( $p < 0,05$ ) between the negative control group and the hydrogel group, and between the reference drug group and the hydrogel group. As a result, this energy-independent controlled release system developed using biocompatible-biodegradable polymers to struggle varroosis infestation; it provides important advantages in terms of protecting the active substance against external conditions and preventing its transport out of the colony by the bees, ensuring sustainability in the struggle without the need for an additional application, limiting the contact-induced toxicity in bees and chemical residues that will occur in bee products and in the environment by controlling the active substance exposure route.

**Keywords:** Acaricidal activity, Bee, Controlled Release System, Thymol, Varroosis.

## KAYNAKLAR

- AGHASİ M, HASHİM Z, MEHRABANİ M, MAHVİ AH (2011). The Development and Validation of an Analytical Method for Simultaneous Determination of Amitraz and Its Metabolite in Air Samples, *Iranian Journal of Toxicology*, 5-14: 470-481.
- AKYOL E, ÖZKÖK D (2005). *Varroa (Varroa destructor)* Mücadelesinde Organik Asitlerin Kullanımı. *Uludağ Bee Journal*, 5: 167-174.
- ANGELO T, PIRES FQ, GELFUSO GM, DA SILVA JKR, GRATIERİ T, CUNHA-FILHO MSS (2016). Development and validation of a selective HPLC-UV method for thymol determination in skin permeation experiments. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 1;1022:81-86.
- ANON (1995). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), ICH. Erişim Adresi: [\[https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf\]](https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf). Erişim Tarihi: 10/09/2019.
- ANON (1996). Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) November 1996 ICH.
- ANON (1998). Validation of Analytical Procedures Methodology-VICH GL2, October 1998 for implementation Step 7. s. 1-10. Erişim Adresi: <https://www.vichsec.org/guidelines/pharmaceuticals/pharma-quality/analytical-validation.html>] Erişim Adresi:[23.12.2018].
- ANON (2001). A Review of Treatment Options For Control of Varroa Mite in New Zealand, Report to the Ministry of Agriculture and Forestry New Zealand.
- ANON (2005). Guideline On Plastic Immediate Packaging Materials, Committee For Medicinal Products For Human Use (CHMP) Committee For Medicinal Products For Veterinary Use (CVMP), London, 19 May 2005 CPMP/QWP/4359/03 EMEA/CVMP/205/04, 1-11.
- ANON (2013). Nosemosis of Honey Bees, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 3.2.4, OIE. 744-749. Erişim Adresi: [\[https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.02.04\\_NOSEMOSIS\\_FINAL.pdf\]](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.02.04_NOSEMOSIS_FINAL.pdf). Erişim Tarihi: 01/10/2021.
- ANON (2014a). Summary of products characteristics- ApiLife Var bee-hive strips for honey bees, The Veterinary Medicines Directorate U.K., August 2014., s. 1-5. Erişim Adresi: [http://www.vmd.defra.gov.uk/productinformationdatabase/SPC\\_Documents/SPC\\_2483\\_95.DOC](http://www.vmd.defra.gov.uk/productinformationdatabase/SPC_Documents/SPC_2483_95.DOC)] Erişim Tarihi: 23/12/2018.
- ANON (2014b). Bal Arılarında Nosemosis'in Mikroskopik Teşhisi, Teşhiste Metot Birliği-Parazitoloji, T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Teşhiste Metot Birliği, Erişim Adresi:

[[https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB\\_Hayvan\\_Sagligi/teshiste\\_metod\\_birligi\\_parazitoloji.pdf](https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Hayvan_Sagligi/teshiste_metod_birligi_parazitoloji.pdf)], Erişim Tarihi:[01/10/2021].

ANON (2015). Varroa mites (Varroaosis or Varroosis), Apimondia, IZSLT - Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, 8416, Erişim Adresi: [<http://www.fao.org/teca/en/technologies/8416>]. Erişim Tarihi: 22/09/2021.

ANON (2016a). Volatile organic compounds in air Laboratory method using sorbent tubes, solvent desorption or thermal desorption and gas chromatography, MDHS 104, HSE, Erişim Adresi: [<https://www.hse.gov.uk/pubns/mdhs/pdfs/mdhs104.pdf>]. Erişim Tarihi: 12/09/2019.

ANON (2016b). Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements, AOAC, Erişim Adresi: [[http://www.eoma.aoac.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf)]. Erişim Tarihi: 13/09/2019.

ANON (2016c). System Suitability, Physical Tests / 621 Chromatography, First Supplement to USP 40–NF 35, Erişim Adresi: [<https://www.bioglobax.com/wp-content/uploads/2018/08/621-Chromatography.pdf>]. Erişim Tarihi: 13/09/2019.

ANON (2018a). Summary of products characteristics- Apiguard gel (%25 Thymol) for beehive use, The Veterinary Medicines Directorate U.K., July 2018., s. 1-5. Erişim Adresi: [[http://www.vmd.defra.gov.uk/productinformationdatabase/SPC\\_Documents/SPC\\_128579.DOC](http://www.vmd.defra.gov.uk/productinformationdatabase/SPC_Documents/SPC_128579.DOC)] Erişim Tarihi: 23/12/2018.

ANON (2018b). Thymol, Compound Summary for CID 6989, Pub Chem-Open Chemistry Database. Erişim Adresi: [<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/thymol>] Erişim Tarihi: 11/12/2018.

ANON (2018c). EU Pesticide database,1040000. Erişim Adresi: [<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.CurrentMRL&language=EN&pestResidueId=2407>] Erişim Tarihi: 11/12/2018.

ANON (2018d.) Council of Europe, European Pharmacopoeia Online 9.0, 3.1 General Notices, 3.2 Containers, 3.2.2. Plastic containers and closures for pharmaceutical use, 423-429.

ANON (2020a). Mutual Recognition Procedure Publicly Available Assessment Report For A Veterinary Medicinal Product Thymovar, DEFRA, Erişim Adresi: [[https://www.vmd.defra.gov.uk/productinformationdatabase/files/UKPAR\\_Documents/UKPAR\\_1989455.PDF](https://www.vmd.defra.gov.uk/productinformationdatabase/files/UKPAR_Documents/UKPAR_1989455.PDF)], Erişim Tarihi: 15/09/2021.

ANON (2020b). Methods, Method Verification and Validation, Food and Drug Administration Office of Regulatory Affairs (ORA) Laboratory, Manual Volume II, Revision Date: 06/30/2020 Erişim Adresi: [<https://www.fda.gov/media/73540/download>]. Erişim Tarihi: 11/09/2020.

ANON (2021a). Guideline on Veterinary Medicinal Products Controlling Varroa Destructor Parasitosis In Bees, EMA/CVMP/EWP/459883/2008-Rev.1\* (CVMP), Erişim Adresi: [[https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-veterinary-medicinal-products-controlling-varroa-destructor-parasitosis-bees-revision-1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-veterinary-medicinal-products-controlling-varroa-destructor-parasitosis-bees-revision-1_en.pdf)]. Erişim Tarihi: 15/09/2021.

- ANON (2021b). Guideline on statistical principles for clinical trials for veterinary medicinal products (pharmaceuticals), EMA/CVMP/EWP/81976/2010-Rev.1\* (CVMP), Erişim Adresi: [[https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-statistical-principles-clinical-trials-veterinary-medicinal-products-pharmaceuticals-rev-1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-statistical-principles-clinical-trials-veterinary-medicinal-products-pharmaceuticals-rev-1_en.pdf)]. Erişim Tarihi: 15/09/2021.
- ANON (2021c). Arıcılık, Hayvansal Üretim İstatistikleri (Yıllık), Türkiye İstatistik Kurumu, İstatistik Veri Portalı, Erişim Adresi: [<https://data.tuik.gov.tr/Search/Search?text=ar%C4%B1>]. Erişim Tarihi: 22/09/2021.
- ANON (2021d). 2.9.5. Uniformity of Mass of Single Dose Preparations, European Pharmacopoeia 10.0 (E.P.).
- ANON (2021e). 2.9.6. Uniformity of content of single-dose preparations, European Pharmacopoeia 10.0 (E.P.).
- AYALA-ZAVALA JF, VİLLEGAS MA, SANTACRUZ H, ALVAREZ-PARİLLA H (2010). Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from b-cyclodextrin capsules, *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, **67**: 431–441.
- AYAN A, URAL K, ALDEMİR OS, TUTUN H (2017). Van Bölgesindeki Bal Arılarında (*Apis mellifera*) Görünen *Varroa destructor*'un Genetik Karakterizasyonunun Belirlenmesi, *MAKÜ Sag Bil Enst Derg*, **5**(2): 78-84.
- AYBASTIER O, DEMİR C (2017). Antioxidant Activity Assay of Phenolic Compounds Isolated from *Origanum Onites* L. Aromatic Water by High Performance Liquid Chromatography, *Ann Nutr Disord & Ther*, **4**(3): 1048.
- AYDIN L, GİRİŞGİN AO (2010). Türkiye'de *Varroa destructor* ile doğal enfeste bal arısı kolonilerinde Apivar®'ın (Amitraz) Etkisi. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, **10**(3): 96-101.
- BALKAYA İ, GÜLBAZ H, AVCIOĞLU H, GÜVEN E (2016). Türkiye'de Görülen Bal Arısı (*Apis mellifera*) Hastalıkları. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, **11**(3): 339-347.
- BHALERAO YP, WAGH SJ (2018). A Review on Thymol Encapsulation and Its Controlled Release Through Biodegradable Polymer Shells, *IJPSR*, Vol. **9**(11): 4522-4532.
- BISRAT D, JUNG C (2020). Insecticidal Toxicities of Three Main Constituents Derived from *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turrill Fruits against the Small Hive Beetles, *Aethina tumida* Murray. *Molecules.*, **25**(5): 1100.
- BLACQUIÈRE T, ALTREUTHER G, KRİEGER JK (2017). Evaluation of the Efficacy and Safety of Flumethrin 275 mg Bee-hive Strips (PolyVar Yellow®) against *Varroa destructor* in Naturally Infested Honey Bee Colonies in a Controlled Study. *Parasitol Res*, **116**: 109–122.
- BLENAU W, RADEMACHER E, BAUMANN A (2011). Plant essential oils and formamidines as insecticides/ acaricides: what are the molecular targets?, *Apidologie*, (2012) **43**: 334–347.

- BOGDANOV S, IMDORF A, KİLCHENMANN V (1998). Residues in wax and honey after Apilife VAR® treatment, *Apidologie*, **29**: 513-524.
- CABRAS P, FLORIS I, GARAU VL, MELIS M, PROTA R (1997). Fluvalinate content of Apistan® strips during treatment and efficacy in colonies containing sealed worker brood, *Apidologie*, **28**: 91-96.
- CHEN EY, LIU WF, MEGİDO L, DÍEZ P, FUENTES M, FAGER C, OLSSON E, GESSNER I, MATHUR S (2018). Chapter 3- Understanding and utilizing the biomolecule/nanosystems interface, Editor(s): Vuk Uskoković, Dragan P. Uskoković, In Micro and Nano Technologies, Nanotechnologies in Preventive and Regenerative Medicine, Elsevier, p. 207-297.
- ÇETİN U (2004). Isı Değişimlerinin Arı Kayıplarına Etkileri, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, **4**:171-174.
- DAHLGREN L, JOHNSON RM, SIEGFRIED BD, ELLIS MD (2012). Comparative Toxicity of Acaricides to Honey Bee (*Hymenoptera: Apidae*) Workers and Queens, *J of Economic Entomology*, **105**(6): 1895-1902.
- DAŞ YK, AKSOY A (2015). Arıcılıkta Hatalı İlaç Kullanımının Sağlık ve Ekonomi Üzerine Etkileri, Marka Bal Olma Yolunda Samsun Sempozyumu, Erişim Adresi: [https://www.researchgate.net/publication/322682624], Erişim Tarihi: 26.11.2018
- DEDIC M, BECIC E, IMAMOVIC B, ZIGA NB, MEDANHODZIC-VUK SC, SOBER M, (2018). HPLC method for determination the content of thymol and carvacrol in Thyme tincture. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, **50**: 1-6.
- EMSEN B, DODOLOGLU A (2011). Efficacy of Different Organic Compounds Against Bee Mite (*Varroa destructor* Anderson and Trueman) in Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Colonies. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **10**: 802-805.
- EVANS JD, COOK SC (2018). Genetics and physiology of *Varroa* mites, *Current Opinion in Insect Science*, **26**: 130-135.
- FIRATLI Ç, KARACAOĞLU M, GENÇER HV, GÜREL F, KOÇ AU (2010). Türkiye Arıcılığının Yapısal Analizi. Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, Ankara Erişim Adresi: [https://www.researchgate.net/publication/258844593\_Turkiye\_ariciliginin\_yapisal\_analizi]. Erişim Tarihi: 26/11/2018.
- FLORIS I, SATTA A, CABRAS P, GARAU VL, ANGIONI A (2004). Comparison Between Two Thymol Formulations in the Control of *Varroa destructor*: Effectiveness, Persistence, and Residues. *J. Econ. Entomol.*, **97**(2): 187-191.
- FRAGKOU D, STEVENSON V (2012). Study of Beehive and its potential "biomimicry" application on capsule hotels, Conference: People and Buildings in Tokyo, Japan. Erişim Adresi: [https://www.researchgate.net/publication/235780081\_Study\_of\_Beehive\_and\_its\_potential\_biomimicry\_application\_on\_capsule\_hotels\_in\_Tokyo\_Japan]. Erişim Tarihi: 26/11/2018.

- GARRIDO C (2018). Thymol-Varroa Control, *Bee Culture The Magazine of American Beekeeper*, Erişim Adresi: [<https://www.beeeculture.com/thymol-Varroa-control/>]. Erişim Tarihi: 05/11/2018.
- GASHOUTL HA, GUZMÁN-NOVOA E (2009). Acute toxicity of essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, *Varroa destructor*, and to larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.), *Journal of Apicultural Research and Bee World*, **48(4)**: 263-269.
- HAJIMEHDIPOOR H, SHEKARCHI M, KHANAVI M, ADIB N, AMRI M (2010). A validated high performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. *Pharmacogn Mag.*, **6(23)**: 154-158.
- HARRIS J, SHERIDAN AB, MacGOWN JA (2019). Managing *Varroa* Mites in Honey Bee Colonies, *Mississippi State University Extension*, Publication 2826 (POD-06-19), Erişim Adresi: [[http://extension.msstate.edu/sites/default/files/publications/publications/p2826\\_web.pdf](http://extension.msstate.edu/sites/default/files/publications/publications/p2826_web.pdf)]. Erişim Tarihi: 15/09/2021.
- HEYDEN VY, NIJHUIS A, SMEYERS-VERBEKE J, VANDEGINSTE BG, MASSART DL (2001). Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **24(5-6)**: 723-753.
- HUYNH CT, LEE DS (2014). Controlled Release, *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*, Editors; KOBAYASHI S, MÜLLEN K, Springer, Berlin, Heidelberg. p. 1-12.
- IMDORF A, KILCHENMANN V, MAQUELIN C, BOGDANOV S (1994). Optimierung der Anwendung von 'Apilife VAR' zur Bekämpfung von *Varroa jacobsoni* Oud in Bienenvölkern, *Apidologie*, **25**: 49-60.
- IMDORF A, KILCHENMANN V, BOGDANOV S, BACHOFEN B, BERETTA C (1995). Toxizität von Thymol, Campher, Menthol und Eucalyptol auf *Varroa jacobsoni* Oud und *Apis mellifera* L im Labortest, *Apidologie*, **26**: 27-31.
- IMDORF A, BOGDANOV S, OCHOA RI, CALDERONE NW (1999). Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies, *Apidologie*, **30**: 209-228.
- IMDORF A, BOGDANOV S, KILCHENMANN V, BERGER T (2006). Toxic Effects of Essential Oils and Some of Their Components On *Varroa Destructor* Oud And *Apis Mellifera* L Under Laboratory Conditions, Animal Production and Dairy Products (ALP) Swiss Bee Research Centre, 495. Erişim Adresi: [<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CH2006000172>]. Erişim Tarihi: 22/09/2021.
- JAMAL M, AZIZ A, NAEEM M, IQBAL Z, KHALID A, SIDDIQUE F, KHAN K, GHRAHM H (2020). Detection of flumethrin acaricide residues from honey and beeswax using high performance liquid chromatography (HPLC) technique. *Journal of King Saud University - Science.*, **32(3)**: 2229-2235.
- KANG HW, TABATA Y, IKADA Y (1999). Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, **20(14)**: 1339-1344.
- KAUR R, KUKKARB D, BHARDWAJ SK, KİMD KH, DEEPC A (2018). Potential use of

polymers and their complexes as media for storage and delivery of fragrances, *Journal of Controlled Release*, **285**: 81–95.

KAYA S (2007). Kemoterapötikler, Veteriner Farmakoloji. Cilt 2. Baskı 4. Editör: S.Kaya Medisan Yayınları, Ankara. s. 331.

KAYAALP SO (2007). İn Vitro Laboratuvar İncelemelerinin Biyoeşdeğerlik Çalışmalarındaki Yeri ve Önemi Bildirisi, Türk Farmakoloji Derneği 19. Ulusal Farmakoloji Kongresi Karadeniz Teknik Ü. Tıp Fakültesi Trabzon, 24 Ekim 2007, Erişim Adresi: [[http://tfd.org.tr/sites/default/files/Klasor/Dosyalar/kongreler/TFD\\_kongre\\_2007/tfd2007\\_14\\_Kayaalp.pdf](http://tfd.org.tr/sites/default/files/Klasor/Dosyalar/kongreler/TFD_kongre_2007/tfd2007_14_Kayaalp.pdf)]. Erişim Tarihi:22/02/2017.

KİM JR (2004). Microencapsulation Technology Using Essential Oils to Produce Acaricides Against House Dust Mites, The University of Georgi Master of Science Thesis. Erişim Adresi: [<https://pdfs.semanticscholar.org/6ac0/b6d0b0f3e74f9ba3adae8946574a98bb4e77.pdf>]. Erişim Tarihi:10/12/2018.

KORKMAZ N, DEMİRBAĞ S, TÖZÜM MS, AKSOY SA, SİVRİ Ç, (2014). Fabrication of Cross-Linked Gelatin Electrospun Nanofibers Containing Rosemary Oil For Antibacterial Application, *ACC Journal*, **20(1)**: 39-48.

LIU C (2016). *Moisture Triggered Release of Thymol from Electrospun Mats to Extend Shelf Life of Fresh Tomatoes*, Master of Science Thesis, Graduate School-New Brunswick Rutgers, the State University of New Jersey. Erişim Adresi: [<https://rucore.libraries.rutgers.edu/rutgers-lib/49256/>]. Erişim Tarihi: 10/12/2018.

LOUCHARD BO, COSTA LC, SILVA ARA, LEAL LKAM (2017). Validation of A High Performance Liquid Chromatography Method to Quantify Thymol in Nanocapsules of Bioactive Essential Oil from *Lippia Sidoides*. *Int J Complement Alt Med*, **10(2)**: 1-7.

MAES C, BOUQUILLON S, FAUCONNIER ML (2019). Encapsulation of Essential Oils for the Development of Biosourced Pesticides with Controlled Release: A Review. *Molecules*, **24(14)**: 25-39.

MARQUES HMC (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles, *flavour fragr.*, **25**: 313–326.

MARTEL AC, ZEGGANE S (2002). Determination of acaricides in honey by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Journal of chromatography. A*, **954(1-2)**: 173–180.

MARTINS MI, RODRIGUES SN, BARREIRO MF, RODRIGUES AE (2011). Release of Thyme Oil from Polylactide Microcapsules, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **50 (24)**:13752–13761.

MARTINS MI, RODRIGUES SN, BARREIRO MF, RODRIGUES AE (2012). Release Studies of Thymol and p-Cymene from Polylactide Microcapsules, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **51**: 11565–11571.

MARTINS MI, RODRIGUES SN, BARREIRO MF, RODRIGUES AE (2014). Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications, *Chemical Engineering Journal*, **245**: 191-200.

- MEIKLE GW, WEISS M, MAES PW, FITZ W, SNYDER LA, SHEEHAN T, MOTT BM, ANDERSON KE (2017). Internal hive temperature as a means of monitoring honey bee colony health in a migratory beekeeping operation before and during winter, *Apidologie*, **48**: 666–680.
- MORETTI MDL, PASSINO GS, DEMONTIS S, BAZZONI E (2002). Essential Oil Formulations Useful as a New Tool for Insect Pest Control, *AAPS PharmSciTech*, **3**(2-13): 1-11.
- MORTENSEN AN, JACK CJ, MCCONNELL M, TEIGEN L, ELLIS J (2019). How to Quantify *Nosema* Spores Infection Rate in a Honey Bee Colony, University of Florida Extension, ENY-167 Erişim Adresi: [<https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN112300.pdf>]. Erişim Tarihi: 16/09/2021.
- MUTINELLI F (2013). European Legislation Governing The Authorisation of Veterinary Medicinal Products With Particular Reference to The Use of Drugs For The Control of Honey Bee Diseases, *Apiacta*, **38**(2003):156-168.
- MUTINELLI F (2016). Veterinary medicinal products to control *Varroa destructor* in honey bee colonies (*Apis mellifera*) and related EU legislation – an update, *Journal of Apicultural Research*, **55**: 78-88.
- NOUREDDINE A, HADDAD NJ (2016). Effectiveness of Treatments with Thymol in Controlling *Varroa destructor* Parasite of The Honey Bee in Algeria, *Bulletin of Pure and Applied Sciences.*, **35**: 1-7.
- IMANI R, RAFIENIA M, EMAMI SH (2013). Synthesis and characterization of glutaraldehyde-based crosslinked gelatin as a local hemostat sponge in surgery: An *in vitro* study, *Bio-Medical Materials and Engineering*, **23**: 211–224.
- ÖZGÜNDÜZ Hİ (2002). Akrilik Asit-Akrilamid-Poli(Vinil Alkol) İçeren Yarı-Ipn Tipi Hidrojellerin Şişme Özellikleri ve Lipaz Salım Davranışları, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- PAITHANKAR H (2013). Hplc Method Validation for Pharmaceuticals: A Review. *International Journal of Universal Pharmacy and Biosciences.*, **2**: 229-240.
- PLETTNER E, ELIASH N, SINGH NK, PINNELLI GR, SOROKER V (2017). The chemical ecology of host-parasite interaction as a target of *Varroa destructor* control agents. *Apidologie*, **48**: 78–92.
- QODRATOLLAH S, HANAN G, PAUL GK, ERNESTO GN (2017). Continuous release of oregano oil effectively and safely controls *Varroa destructor* infestations in honey bee colonies in a northern climate. *Exp Appl Acarol*, **72**: 263–275.
- RAMOS M, BELTRAN A, PELTZER M, VALENTE AJM, GARRIGOS MDC (2014). Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films, *LWT - Food Science and Technology*, **58**(2): 470–477.
- RAMOS M, BELTRAN A, FORTUNATI E, PELTZER M, CRİSTOFARO F, VISAI L, VALENTE AJM, JIMENEZ A, KENNY JM, GARRIGOS M (2020). Controlled Release

- of Thymol from Poly(Lactic Acid)-Based Silver Nanocomposite Films with Antibacterial and Antioxidant Activity. *Antioxidants.*, **9(5-395)**: 1-19.
- REDDY A, KARTHIKEYAN R, VEJANDLA R, BABU P (2017). Controlled Release Matrix Drug Delivery System – A Review. *INT. J. OF ALLIED MED. SCI. AND CLİN. RESEARCH.*, **5**: 384-398.
- ROSENKRANZ P, AUMEIER P, ZIEGELMANN B (2009). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103**: 96–119.
- RUFFINENGO SR, MAGGI MD, FUSELLI S, DE PIANO FG, NEGRI P, BRASESCO C, SATTA A, FLORIS I, EGUARAS MJ (2014). Bioactivity of microencapsulated essentials oils and perspectives of their use in the control of *Varroa destructor*, *Bulletin of Insectology*, **67(1)**: 81-86.
- RUSHWORTH ID, HIGGITT C, MARGARET SM, GIBSON LT (2014). Non-invasive multiresidue screening methods for the determination of pesticides in heritage collections, *Heritage Science*, **2(3)** 1-8.
- SANCHEZ ML, RAMOS MJG, GOMEZ-RAMOS MM, VAZQUEZ PP, FLORES JM, FERNANDEZ-ALBA AR (2021). Presence, persistence and distribution of thymol in honeybees and beehive compartments by high resolution mass spectrometry, *Environmental Advances*, **5**: 1-7.
- SANGHVI R, NARAZAKI R, MACHATHA S, YALKOWSKY S (2008). Solubility Improvement of Drugs using N-Methyl Pyrrolidone. *AAPS Pharm SciTech.*, **9**: 366-376.
- SCHLITT H (1997). Impinger sampling coupled to high-performance liquid chromatography by a modified autoinjector interface, *Journal of Chromatography A*, **762**: 187-192.
- SEMERÇİ A (2017). Türkiye Arıcılığının Genel Durumu ve Geleceğe Yönelik Beklentiler. *MKÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, **22(2)**: 107-118.
- SEVEN-ÇAKMAK S, ÇAKMAK İ, FUCHS S, KANDEMİR İ (2017). Bal Arısı (*Apis Mellifera Anatoliaca*) Kolonilerinde Pudra Şekerı Yöntemi İle *Varroa (Varroa Destructor)* Bulaşıklık Seviyesinin Belirlenmesi ve Koloni Seçimi, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, **17(1)**: 7-23.
- SHABIR GA (2004). Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry. *Journal of validation technology*, **10**: 314-324.
- SHRIVASTAVA A, GUPTA VB (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, **2**: 21-25.
- SOUTHWICK EE, MORITZ RFA (1987). Social Control of Air Ventilation in Colonies Of Honey Bees, *Apis Mellifera*, *J. Insect Physiol.* Vol., **33(9)**: 623-626.
- SOUZA JM, CALDAS AL, TOHIDI SD, MOLINA J, SOUTO AP, FANGUEIRO R, ZILLE A (2014). Properties and controlled release of chitosan microencapsulated limonene oil, *Rev Bras Farmacogn*, **24**: 691-698.

- SÖNMEZ F (2010). *Varroa destructor* ile Doğal Enfeste Bal Arısı Kolonilerinde Bazı Eterik Yağların Kullanımı ve Etkinliği, Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- SUDARSAN R, THOMPSON C, KEVAN PG, EBERL HJ (2016). “Beehive Ventilation: We Need to Know More and Do Better”, Erişim Adresi: [<https://tr.scribd.com/document/388551388/Hive-Ventilation-Linton-pdf>]. Erişim Tarihi: 05/01/2019.
- TIHELKA E (2018). Effects of synthetic and organic acaricides on honey bee health, *Slov Vet Res*, **55**(2): 119-140.
- TOLEDO VAA, NOGUEIRA-COUTO RH (1999). Thermoregulation in colonies of africanized and hybrids with Caucasian, Italian and Carniolan *Apis mellifera* honey bees. *Braz. arch. biol. technol.*, **42**(4): 425-431.
- TROUILLER J (2004). Apiguard: An Instrument Adapted to Many Beekeeping Conditions, *Apiacta*, **38**: 328-333.
- ÜNAL HH, ORUÇ HH, SEZGİN A, KABİL E (2010). Türkiye’de, 2006-2010 Yılları Arasında, Bal Arılarında Görülen Ölümmler Sonrasında Tespit Edilen Pestisitler, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, **10**(4): 119-125.
- XIE K, TASHKIN DP, LUO MZ, ZHANG JY (2019). Chronic toxicity of inhaled thymol in lungs and respiratory tracts in mouse model. *Pharmacol Res Perspect.*, **7**: 1-10.
- YOU Y, SUN X, CUI Q, WANG B, MAJ (2016). The Retention and Drainage Behavior of Cross-linked Gelatin with Glutaraldehyde in a Papermaking System. *Bioresources*, **11**(3): 6162-6173.
- ZAMANI Z, ALIPOUR D, MOGHIMI HR, MORTAZAVI SAR, SAFFARY M (2015). Development and Evaluation of Thymol Microparticles Using Cellulose Derivatives as Controlled Release Dosage Form, *Iranian journal of pharmaceutical research*, **14**(4):1031-1040.
- ZHU Z, MIN T, ZHANG X, WEN Y (2019). Microencapsulation of Thymol in Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA): Physical and Antibacterial Properties. *Materials*, **12**(7): 1133-1143.

## EKLER

### Ek-1. Etik Kurul Kararı



T.C.  
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI  
PENDİK VETERİNER KONTROL ENSTİTÜSÜ HAYVAN DENEYLERİ  
YEREL ETİK KURULU

Sayı:202

26.12.2018

Karar No:17/2018

Başvuru Tarihi: 18.12.2018

**Sayın Onur DEMİR**

Sorumluluğunu üstlendiğiniz "Varroazis Mücadelesi İçin Alternatif Kontrollü Akarisit Salım Formülasyonu Geliştirilmesi ve Etkinliğinin Değerlendirilmesi" isimli çalışmanız kurumumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul kapsamı dışında olduğundan Etik Kurul kararına gerek olmadığı kararı verilmiştir.