

**COVID 19 PANDEMİSİ SEBEBİYLE BAĞIŞIKLIK SİSTEMİNİ
GÜÇLENDİRME AMAÇLI TÜKETİLEN PROPOLİS İÇEREN TAKVİYE
EDİCİ GIDALARIN ÜLKEMİZDE VE DİĞER ÜLKELERDE KULLANIMI VE
DENETİM SÜREÇLERİ**

Yüksek Lisans Tezi

Fatma ÖZENEN

Eskişehir 2022

**COVID 19 PANDEMİSİ SEBEBİYLE BAĞIŞIKLIK SİSTEMİNİ
GÜÇLENDİRME AMAÇLI TÜKETİLEN PROPOLİS İÇEREN TAKVİYE
EDİCİ GIDALARIN ÜLKEMİZDE VE DİĞER ÜLKELERDE KULLANIMI VE
DENETİM SÜREÇLERİ**

Fatma ÖZENEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Göksel ARLI

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Nisan 2022

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Fatma ÖZENEN'nin "COVID 19 Pandemisi Sebebiyle Bağışıklık Sistemini Güçlendirme Amaçlı Tüketilen Propolis İçeren Takviye Edici Gıdaların Ülkemizde ve Diğer Ülkelerde Kullanımı ve Denetim Süreçleri" başlıklı tezi 15/04/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Analitik Kimya Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Göksel ARLI
Üye	: Prof. Dr. Tufan GÜRAY
Üye	: Dr.Öğr.Üyesi Murat SOYSEVEN

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ÖZET

COVID 19 PANDEMİSİ SEBEBİYLE BAĞIŞIKLIK SİSTEMİNİ GÜÇLENDİRME AMAÇLI TÜKETİLEN PROPOLİS İÇEREN TAKVİYE EDİCİ GIDALARIN ÜLKEMİZDE VE DİĞER ÜLKELERDE KULLANIMI VE DENETİM SÜREÇLERİ

Fatma ÖZENEN

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Nisan 2022

Danışman: Prof. Dr. Göksel ARLI

COVID-19 ilk olarak Çin’de gözlenmiştir ve kısa sürede tüm dünyaya hızla yayılmıştır. Bu durum Dünya Sağlık Örgütü’nün COVID-19 salgınını küresel bir pandemi olarak açıklamasına yol açmıştır. COVID-19 pandemisinin sebep olduğu yüksek sayıda ölümler ve diğer türde zararlar dikkate alındığında, yeni koronavirüsü potansiyel olarak durdurabilecek, güvenilir, bulaşıcılığını azaltacak ve/veya enfeksiyon semptomlarını hafifletebilecek tedavilerin bulunmasına acil ihtiyaç duyulmaktadır.

Propolisin içerdiği flavonoidlerin pek çok antiviral etkileri olduğu önceki araştırmalarda tespit edilmiştir ve antiviral mekanizması sebebiyle 2019’da çok hızlı yayılan COVID-19 tedavisi sürecinde kullanılabilirliği konusunda araştırılması gereken bir bileşen olarak görülmüştür. Biyoaktif bitki parçaları ve reçineden arılar tarafından yapılan doğal bir ürün olan propolis, bağışıklık sistemini düzenleyici etkisiyle sağlığı destekleyici olarak bilinirliği sebebiyle, önceden beri dünyanın pek çok bölgesinde büyük oranda kullanılmaktadır. Ham propolisin kimyasal bileşimi ve biyolojik aktiviteleri bitki türü kaynağına, arı türüne, iklim özellikleri gibi çevresel faktörlere, propolisin hasat zamanı ve tekniğine göre, hatta kullanılan ekstraksiyon sıvısı ve metoduna göre değişkenlik göstermektedir. Propolisin botanik kaynağının tespit edilmesi, propolisi tanımlamada ve propolis standartlaştırma çalışmalarında çok önemlidir. Genel olarak propolis, polifenol (flavonoidler, fenolik asitler ve esterler), fenolik aldehitler ve ketonlar, vb. içermektedir. Propolis ile yapılan diğer laboratuvar araştırmaları propolisin; antiseptik, antiinflamatuvar, antioksidan, antibakteriyel, antimikotik, antifungal, natiülser, antikanser, yara iyileştirici ve bağışıklığı düzenleyici özellikler gibi pek çok biyolojik etkinliğe sahip olduğunu kaydetmiştir. Propolis ekstraksiyon metodları son ürün özelliklerini etkileyebilmektedir çünkü farklı çözücüler farklı bileşenleri çözmekte ve ekstrakte etmektedir. Propolis içeren gıda takviyelerinin güvenilirliği tüketiciler için çok önemlidir. Bu amaçla yasal düzenlemeler, HACCP, iyi arıcılık uygulamaları gıda takviyesinin güvenilirliğini sağlayan önemli etkenlerdir. Propolis içeren gıda takviyelerinin güvenilirliği ve izlenebilirliği için yasal düzenlemeler yapılmalıdır.

Anahtar Sözcükler: COVID-19, Propolis, Ekstraksiyon, Takviye Edici Gıda.

ABSTRACT

BECAUSE OF THE COVID-19 PANDEMY AND TO STRENGTHEN THE IMMUNE SYSTEM, THE USE OF FOOD SUPPLEMENTS CONTAINING PROPOLIS IN OUR COUNTRY AND IN OTHER COUNTRIES AND THE INSPECTION PROCESS STEPS

Fatma ÖZENEN

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, April 2022

Supervisor: Prof. Dr. Göksel ARLI

COVID-19 has been first observed in China, and in a short time, this outbreak has quickly surrounded the whole World. This lead WHO to declare the COVID-19 outbreak a pandemic. Large number of people died and damage that the COVID-19 pandemic has caused showed that, there's a very quick need to find treatments and they should have been approved as safe and able to inhibit the new coronavirus, reduce its infectivity, and propriate the symptoms of infection.

Because propolis flavonoids have many antiviral effects, so in terms of the antiviral mechanism, it has been seen as a very potential research object in the fight against COVID-19 outbreaked in 2019. Bees make Propolis as a natural product from resins and bioactive plant parts and it is already extensively consumed in different regions of the World. With plant species source and other factors, chemical composition and biological activities of raw propolis vary. Other factors that varies the characteristics of propolis are; bee species, environmental factors as climate characteristics, the time and technique of harvest and also with the extraction method and solvent used. Propolis composition gives the clues to standardisation. Generally propolis includes polyphenols (flavonoids, phenolic acids etc.) phenolic aldehydes, ketones. Laboratory investigations and studies have documented a wide range of biological activities which are; antibacterial, antifungal, antiseptic, wound healing, anti-inflammatory, antioxidant, antimycotic, antiulcer, anticancer, and immunomodulatory properties. The extraction methods can effect the last product properties, as different solvents can solve and extract different components. As a food supplement, the regulations about propolis of different countries have been viewed. The safety of propolis and food supplements derived from propolis is very important for consumers. Factors that ensure food supplement safety are national regulations, HACCP, good beekeepers practices and so on. International Legislative regulations should be practiced for the safety and traceability of the food supplements with propolis.

Keywords: COVID-19, Propolis, Extraction, Food Supplement.

TEŞEKKÜR

COVID-19 Pandemisi sürecinde bu çalışmayı gerçekleştirirken her konuda bana yardımcı olan, değerli bilgi ve deneyimlerini paylaşan ve bana yön veren, sabırla anlayış gösteren Sayın Prof. Dr. Göksel ARLI'ya,

Yüksek lisans tezimin hazırlama aşamasında her konuda yardımcı olan ve bilimsel ve etik açıdan bilgi ve deneyimlerini paylaşan ve bana yön veren Sayın Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ'ye,

Yüksek lisans yapmam ve bilimsel anlamda kendimi geliştirmem konusunda beni destekleyen, cesaretlendiren sevgili Canan RUBAN ÖZBEK'e,

Yüksek lisans dönemimde ve tez dönemimde her zaman desteklerini hissettiğim, her anımda yanımda olan, zor zamanlarımda bana yardımcı olan, sevgili arkadaşım, meslektaşım Serpil ULUDAĞ GÜNER'e,

Araştırmalarım sırasında teknik anlamda destek veren Sayın Bülent GÜNAY'a,

Arıcılık konusunda bilgilerini, deneyimlerini paylaşan mesai arkadaşlarım ve hocalarım Sayın Bahri SERTÇELİK ve Sayın Muzaffer AKGÜN'e,

Her türlü sorumu sabırla cevaplayan, tezimi bitirme konusunda ümitsizliğe düştüğüm anlarda defalarca destek ve cesaret veren, başarı ve sabırla çalışma konusunda örnek aldığım Sayın Erdem YENİYOL'a,

Her anımda sevgi ve güvenleriyle bana güç veren, aldığım her kararda beni destekleyen, cesaretlendiren ve sabırla bana yol gösteren, çok değerli ailem, sevgili kızlarım Ayşe Gevher ERDOĞAN ve Meryem ERDOĞAN'a

En içten teşekkürlerimi sunuyorum.

.../04/2022

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....

Fatma ÖZENEN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
GÖRSELLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. COVID-19 PANDEMİSİ	1
1.1.COVID-19 Pandemi Süreci.....	1
2. BAĞIŞIKLIK GÜÇLENDİRME AMAÇLI TAKVİYE EDİCİ	3
GIDA; PROPOLİS	
2.1. Propolisin Tarihçesi.....	4
2.2. Arıcılık Ürünü Propolis	5
2.3. Arıların Propolis toplama İhtiyacı	6
2.4. Arıların Propolisi Toplaması	7
2.5. Propolis Eldesinde Uygunsuzluklar	8
2.6. Uygun Propolis Elde Etme Yöntemleri	10
2.7. Propolisin Fiziksel Özellikleri	13

	<u>Sayfa</u>
2.8. Propolisin Kimyasal Özellikleri	14
3. PROPOLİS VE STANDARDİZASYON.....	15
3.1 . Propolisin Yapısındaki Polifenoller	18
3.2. Propolisin Fizyolojik Etkileri	19
3.3. Propolis Ekstraksiyonuna Hazırlık	21
3.4. Ekstraksiyon Çözücüsünün Etkisi	21
3.5. Propolis Ekstraksiyon Yöntemleri ve Verimlilikleri	22
3.6. Propolis Klasik Ekstraksiyon Yöntemleri	23
3.7. Gelişmiş Ekstraksiyon Yöntemleri	24
3.8. Propolis Eldesi ve Yapılan Çalışmalar	26
3.9. Propolisin Alerjen Potansiyeli	27
4. PROPOLİSİN STANDARDİZASYONU AMACIYLA TOPLAM.....	28
FENOLİK İÇERİĞİNİN ANALİZ YÖNTEMLERİ	
5. TAKVİYE EDİCİ GIDALARDA PROPOLİS KULLANIMININ.....	32
YASAL DÜZENLEMELERİ	
5.1. Türkiye’de Takviye Edici Gıdalara İlişkin Mevzuat	34
6. SONUÇ	37
KAYNAKÇA	40
ÖZGEÇMİŞ	

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.8. Propolisin genel yapısı.....	14
Tablo 3.1. En yaygın propolis türlerinin bitki orjini ve başlıca içerikleri.....	17
Tablo 3.2. Yapılarına göre sınıflandırılmış polifenollerin listesi.....	20

GÖRSELLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Görsel 2.1. Arka bacaklarında reçine (solda) ve polen (sağda) taşıyan bal arıları	6
Görsel 2.2. Propolis Yüklü Bal Arısı (Robert Lunsford).....	8
Görsel 2.3. (a) Arının mum salgılayışı (b) Mum kristalleri.....	8
Görsel 2.4. Kovan girişini kışın daraltmak için farklı çözümler.....	9
Görsel 2.5. a) Tuzak kullanılarak propolis toplanması b) Kovanda biriken propolisler	11
Görsel 2.6. Brezilya’da arıcıların kullandığı propolis tuzağı.....	11
Görsel 2.7. Kovanın iç duvarlarındaki tuzaklar.....	12
Görsel 2.8. Kahverengi ve sarı propolis örnekleri.....	13
Görsel 4.1. Şematize HPLC cihazı.....	29

SİMGELELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
CAPE	: Caffeic Acid Phenethyl Ester (Kafeik Asit Fenil Ester)
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention (Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi)
COVID-19	: Coronavirus 2019 (Koronavirüs Hastalığı 2019)
EC	: European Community (Avrupa Komitesi)
EFSA	: European Food Safety Authority (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi)
EU	: European Union (Avrupa Birliği)
HACCP	: Hazard Analysis on Critical Control Points (Kritik Kontrol Noktalarında Tehlike Analizi)
HPLC	: High Pressure Liquid Chromatography (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi)
MERS-CoV	: Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (Ortadoğu Solunum Sendromu İlişkili Koronavirüs)
PEE	: Propolis Ethanol Extract (Propolis Etanol Ekstraksiyonu)
PWE	: Propolis Water Extract (Propolis Su Ekstraksiyonu)
SARS-CoV	: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (Ağır Akut Solunum Yolu Yetersizliği Sendromu ile İlişkili Koronavirüs)
WHO	:World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

1. COVID-19 PANDEMİSİ

Ağır Akut Solunum Yolu Yetersizliği Sendromu ile ilişkili Koronavirüs (SARS-CoV; 2002-2003) H1N1 Influenza (2009), Ortadoğu Solunum Sendromu ile ilişkili Koronavirüs (MERS-CoV; 2012), Polio (2014), Zika (2016) gibi bazı viral salgınlar son yirmi yıldır meydana gelmiştir [1].

2020 yılına girmeye hazırlanan dünyada yeni yıl kutlamaları sürerken, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), ülkelerinde Hubei bölgesi, Wuhan şehrinde pnömoni (akciğer iltihabı) benzeri vakaların görüldüğü hakkında bilgilendirme yapılarak Çin resmi uzmanları tarafından uyarılmıştır. Kronolojik olarak, Birleşmiş Devletler Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (CDC) 1 Ocak 2020'de Wuhan'da bir deniz ürünleri pazarını, salgının merkezi olmasından şüphelenilen yer olarak tanımlanmıştır. 11 Ocak 2020'de Çin yeni bir koronavirüs türünün görüldüğünü ve bu virüs tarafından bilinen ilk ölümün 61 yaşındaki bir adam olduğunu açıklamıştır. 3 Şubat 2020'de enfekte olan insan sayısı beklenmedik şekilde hızla artmıştır ve enfeksiyona bağlı ölüm sayısı Çin'de 361'e ulaşmıştır. 11 Şubat 2020'de Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi tarafından bu yeni virüsün ismi, (SARS-CoV-2) "Ağır Akut Solunum Yolu Yetersizliği Sendromu ile ilişkili Koronavirüs 2" olarak açıklanmıştır ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından, Wuhan enfeksiyonu, koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) olarak adlandırılmıştır [2].

1.1. COVID-19 Pandemi Süreci

COVID-19 virüsü insandan insana damlacık yayılımıyla doğrudan, kontamine olmuş materyal ile dolaylı yollardan kolayca yayılabilmektedir. Yayılımın kolay olması COVID-19 vakalarının endişe verici sayılara çıkmasına sebep olmuştur [3]. Her ne kadar COVID-19 ilk olarak Çin'de görülmüş olsa da, bu salgın kısa sürede tüm dünyaya hızla yayılmıştır. Hatta Çin'le kıyaslandığında Hindistan, Brezilya, bazı Avrupa ülkeleri ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD) bu salgından ağır bir şekilde etkilenmiştir [2]. İnsandan insana geçişin kolay olmasının sonucu olarak, salgın tüm dünyada yayılmıştır, bu durum Dünya Sağlık Örgütü'nün COVID-19 salgını küresel bir pandemi olarak açıklamasına yol açmıştır [4]. Hastalığa sebep olan virüsün, Influenza'dan ve öncesinde dünya çapında etkili olan diğer hastalık türlerinden çok daha ölümcül olduğu kısa sürede anlaşılmıştır ve tüm dünya ülkelerini; seyahat sınırlaması getirmek, okulları ve

işyerlerini kapatmak ve pek çok insanın birbiriyle temas kurabileceği tüm mekanları kapatmak gibi görülmemiş önlemler almaya zorlamıştır. Hastalığın etkilerini azaltmak ve hızla artan sayıda ölümlerin önüne geçebilmek amacıyla, çeşitli halk sağlığı hizmeti stratejileri hayata geçirilmiştir, ancak virüs çoğunlukla asemptomatik hastalardan yayılmaya devam ettiği için bu stratejilerin etkinliği sınırlı kalmıştır [5]. Virüsle enfekte olan insanlar çoğunlukla ateşle birlikte öksürük ve nefes darlığı gibi solunum sistemi semptomlarını yaşamışlardır. Her ne kadar çoğu enfekte insan sadece hafif solunum rahatsızlığı yaşayıp özel bir tedavi gerekmeden iyileşse de, yaşlı insanlarda, diyabet kronik solunum sistemi ya da pulmoner rahatsızlıkları gibi altta yatan kronik hastalıklara sahip olan insanlarda virüs büyük olasılıkla ciddi problemlere ve hatta ölüme sebep olmuştur [4].

COVID-19'a yakalanan bu tür hastalar genellikle ciddi viral enfeksiyon geçirmektedir, bağışıklık sistemi baskılanmakta ve bunun sonrasında ilerleyen sitokin fırtınası ve akciğer fibrozu yaşanabilmekte, bunu takip eden çoklu organ yetmezliğinin sonunda virüs hastayı ölüme kadar götürebilmektedir. Hassas ve bağışıklığı baskılanmış bireylerin ciddi COVID-19 komplikasyonları riskine çok daha açık oldukları görülmektedir [3].

Belirli bir tedavi geliştirmek ve COVID-19 salgını önlemek için, COVID-19 hastalarından SARS-CoV-2 olarak adlandırılan virüs izole edilmiştir ve yapısı tanımlanmıştır. Genetik analizler SARS-CoV-2'nin, daha önce görülmüş olan ağır akut solunum yolu yetersizliği sendromu koronavirüse (SARS-CoV) çok büyük oranda benzediğini göstermiştir. Farklı viral enfeksiyonlar ve diğer sebepler (sıtma, parazit ve helmint vb.) için önceden bulunan çeşitli ilaçlar ve belirli antibiyotikler, COVID-19'un tedavisi için aynı anda kullanılmıştır. Bununla birlikte, belirtilen bütün kimyasal ilaçların bazı yan etkileri görülmektedir ve bunların SARS-CoV-2'ye karşı etkili antiviral aktivitesi ve farmakolojik mekanizmaları açık bir şekilde henüz kanıtlanamamıştır [2]. COVID-19'un semptomlarını etkin bir şekilde tedavi ettiği kanıtlanmış belirli, daha önce bilinen bir tıbbi yöntem bulunmamaktadır [3].

COVID-19 pandemisinin sebep olduğu yüksek sayıda ölümler ve diğer türde zararlar dikkate alındığında, güvenilir ve yeni koronavirüsü potansiyel olarak durdurabilecek, bulaşıcılığını azaltacak ve/veya enfeksiyon semptomlarını hafifletebilecek tedavilerin bulunmasına acil ihtiyaç duyulmaktadır [5].

2. BAĞIŞIKLIK SİSTEMİNİ GÜÇLENDİRME AMAÇLI TAKVİYE EDİCİ GIDALAR; PROPOLİS

Tarih boyunca hastalıklardan korunmak ve hastalığın etkisini azaltmaya yardımcı olmak için kullanılmış doğal ürünler, SARS-CoV-2 enfeksiyonu için yardımcı bir tedavi olarak kabul edilmiştir, çünkü doğal ürünler genel olarak ucuzdur, yaygın bir şekilde bulunabilir ve çok nadiren yan etkileri bulunmaktadır [5]. Biyoaktif bitki parçaları ve reçineden arılar tarafından yapılan doğal bir ürün olan propolis, bağışıklık sistemini düzenleyici ve antiviral etki içeren, sağlığı destekleyici olarak bilinirliği sebebiyle, önceden beri dünyanın pek çok bölgesinde büyük oranda kullanılmıştır. Düşük ücretli ve kolaylıkla ulaşılabilen bir ürün olduğu için propolis; Brezilya’da konvansiyonel gıda veya gıda takviyesi olarak, ABD’de diyet takviyesi, Japonya ve Kore’de fonksiyonel gıda, Çin’de sağlıklı gıda olarak sınıflandırılmıştır[6].

Doğal ürünler arasında tanımlanan propolis içeren ürünler, örneğin boğaz spreyleri ve propolis ekstreleri Brezilya’da yüzlerce işletme tarafından üretilmekte ve ülke çapında neredeyse her eczanede sağlığı destekleyici ürün olarak satılmaktadır. Propolis içeren ürünler ve bu tür ürünlerin üretilmesi için gerekli propolis hammaddesi Brezilya’daki işletmeler tarafından işlenmekte ve özellikle Japonya, Güney Kore ve Çin gibi Asya ülkelerine büyük miktarlarda satılmaktadır. Çin, Japonya, Güney Kore ve Rusya’da tıbbi amaçlı propolisin önemi en iyi 2013’de bu ülkelerde kayıt altına alınan propolis içeren ürünlere verilen patent sayısındaki artışta gözlenlenmiştir. 2013 yılında bu ülkelerde propolis içeren ürünlerin kayıt altına alınan patent sayılarında çok büyük artış olmuştur. Çin’de 1200, Japonya, Rusya ve Kore’nin her birinde propolis içeren ürünler için 300-400 civarında patent verilmiştir. 2013’ten 2020’ye kadar yaklaşık 1400 yeni propolis içeren ürün için Amerika Birleşik Devletleri’nde patent ofisine başvurular yapılmıştır.

Propolis geleneksel Çin tıbbında anahtar bir bileşen durumundadır ve Japonya’da bilim insanları tarafından kanser hastalığının tedavisinde çeşitli Brezilya propolis bileşenlerinin etkileri hakkında araştırmalar yapıp yararlılığı ispatlanarak patenti alınmıştır. Koronavirüs pandemisinde Güney Kore’de fonksiyonel gıdaların kullanımında artış olmuştur ve ülkede Gıda ve İlaç Güvenliği Bakanlığı tarafından fonksiyonel gıda kabul edilen propolis hakkındaki düzenlemeler kolaylaştırılmıştır ve yeni oral formülasyonlara izin verilmiştir [5].

Silveira vd. tarafından, Temmuz ve Ağustos 2020 tarihleri arasında, henüz COVID-19'a karşı dünyada aşı çalışmaları devam ederken ve her hangi bir tıbbi önleyici ve tedavi edici yöntem bulunmamışken, hastaneye yatırılarak tedavi edilmekte olan COVID-19 hastalarında ek bir tedavi olarak propolis içeren ürünlerin uygulandığı bir araştırma yürütülmüştür. Yapılan çalışmada COVID-19 hastası olup hastaneye yatırılan ve farklı bölümlerde tedavi görmekte olan hastalara Brezilya yeşil propolisini içeren patentli bir ürünün uygulanmasının sonucunda, propolisin diğer tedavi seçenekleriyle etkileşime girmeden, COVID-19'un kliniksel tedavisine etkisinin ölçülmesi amaçlanmıştır. Her ne kadar Avrupa Tıbbi Ürünler Ajansı tarafından propolis içeren ürünlerin içeriğindeki farklılıklar sebebiyle tüm propolis türleri hakkında güvenilir ve yararlı bilgilere ulaşmanın zor olduğu belirtilse de, bu çalışmada kimyasal ve biyolojik olarak standardize edilmiş bir propolis ürününün geliştirildiği belirtilmiştir. COVID-19 hastalarına oral olarak farklı dozlarda uygulanarak bu propolis ürününün COVID-19 hastalığı için etkinliği ve güvenilirliği değerlendirilmiştir [6].

Araştırma Brezilya'da Salvador, Bahia'da bir hastanede yatmakta olan hastalar üzerinde yürütülmüştür. Çalışmayı kısıtlayıcı bazı unsurlar; hastanede yatmakta olan hastaların demografik ve kliniksel özelliklerinin farklı olduğu, hastalık seyirleri farklı olduğu için servis ve yoğun bakım gibi farklı birimlerde tedaviye devam edildiği, aralarında COVID-19'la birlikte başka hastalıklara sahip hastalar olduğu, tedavi amaçlı uygulanan tıbbi yöntemlerin farklı olduğudur. Bununla birlikte, propolis ürünü hastalara farklı dozlarda uygulanmış ve sonuçta genel olarak standart tedavi yöntemine oral propolis ürününün ilavesinin güvenilir olduğu, propolis içeren ürün sayesinde hastaların hastalık belirtilerini daha kolay atlattıkları ve hastanede kalış sürelerinin kısaldığı sonuçlarına ulaşılmıştır [6].

2.1. Propolisin Tarihçesi

Propolis tabii ki yeni bir buluş değildir. Propolisin insanoğlu tarafından kullanımı neredeyse M.Ö. 300 yılı gibi eski çağlara kadar geçmişe dayanmaktadır ve hem ihtiyaç duyulan bölgeye dıştan sürülerek, hem de ağız yoluyla alınarak dünyanın pek çok yerinde yerel ve popüler tıpta bir ilaç olarak kullanılmıştır [7]. Yüzyıllar boyunca propolis, deri apselerinin tedavisinde, Romalılar tarafından kullanılmışlardır. Hipokrat tarafından propolis çeşitli hastalıklarda kullanılmıştır ve özellikle sindirim sistemi hastalıkları, deri hastalıkları, ülser tedavisinde kullandığını belirtmiştir [8]. Eski

Mısırlılar tarafından propolisin iyileştirici etkisi bilindiği için, yaraları iyileştirmede, cesetlerin bozulmasını önlemek için mumyalarken, koruyucu madde olarak propolis kullanılmıştır. Benzer şekilde, Güney Afrika'da Anglo-Boer Savaşı sırasında ve 2. Dünya Savaşı'nda propolis yaraların tedavisinde hekimler tarafından etkin şekilde kullanılmıştır [9]. İnkalar propolisten ateş düşürücü ilaç olarak yararlanmışlardır ve propolis çeşitli Avrupa ülkelerinde resmi ilaç olarak listelenmiştir [10]. Benzer şekilde propolis Çin'de, kanser tedavisinde ve enfeksiyon tedavisinde etkili bir ilaç olarak tanınmaktadır. Propolis bileşimi ve kimyasal etkileri hakkında ilk bilimsel rapor 1908'de yayımlanmıştır [9]. Bununla birlikte, günümüzde şifa verici olarak, kişisel bakım ürünlerinde ve karışım hazırlamada kullanılmaya devam edilmektedir [7]. 60'lı yılların sonundan beri propolisin bu özellikleri bilim adamlarının dikkatini çekmektedir [8]. Özellikle propolisin ekstraksiyonu ile takviye edici gıda üretilen ülkeler başta olmak üzere, pek çok ülkede 2000 yılından sonra propolisle ilgili bilimsel araştırmaların %80'inin yapılarak yayımlanmış olması, propolise artan ilginin bir göstergesi olarak nitelendirilebilir [11].

2.2. Arıcılık Ürünü Propolis

Arıların (*Apis mellifera* L.) ürettiği bir ürün olan propolis, bitkileri gezerek tomurcuklarından ve salgılarından topladıkları, enzimatik değişikliklere uğratarak hazırladıkları bir üründür [11]. Arılar tarafından propolis ile kovan girişi kaplanmaktadır ve dışarıdan gelen arılar propolis kaplı bir kanaldan geçerek kovana girmektedirler. Bu suretle hem kendilerinin hem de kovanın hijyeni korunmaktadır. Propolis kelimesi kovana koruyucu gibi girişini kapladığı için, Yunanca "pro" ön/giriş ve yine Yunanca "polis" şehir anlamına gelen iki kelimenin birleşmesinden oluşmuştur. Yani, arıların içerisinde yaşadığı bir şehir olarak kovan kabul edilirse, "şehrin güvenliğinden sorumlu madde" olarak propolis düşünülebilir [11].

Propolisin arılar tarafından "üretilmesi" amacına uygun materyaller, bitkiler tarafından etkin bir şekilde salgılanan maddeler olduğu gibi, bitkideki yaralı kısımdan salgılanan maddeler, yapraklardaki lipofilik maddeler, yaprak tomurcukları, reçineler, müsilajlar, zamksı maddeler, ağsı yapılar vb. maddeler de bu amaç için uygundur [12].

Bitkiler tarafından patojenlere karşı kendilerini savunabilmek için genellikle, çoğu ekstrakte edilmiş ve tıpta ilaç olarak kullanılmış olan fitokimyasallar kullanılmaktadır.



Görsel 2.1. Arka bacaklarında reçine (solda) ve polen (sağda) taşıyan bal arıları. Tarlacı arıların reçine yüklerinin yapısı yarı şeffafken, polen yüklerinin yapısı opak ve tozlu görünümündedir (M. Simone – Finstrom, 2016)

Bal arıları ve diğer arı toplulukları tarafından, bitkilerin bu antimikrobiyel özellikleri tespit edilip, koloniyi korumak için kullandıkları propolisi üretmek için bitki ürünleri özellikle seçilerek toplanmakta ve işlenmektedir. Bal arıları tarafından propolisin toplanması ve kullanılması şunu açığa çıkarmıştır ki, arı topluluklarının bağışıklık genleri yalnız yaşayan diğer böcek türlerine göre oldukça azdır. Daha fazla propolis toplayan ve üreten arı kolonileri daha sağlıklıdır, daha uzun yaşarlar ve arılar tarafından propolis kullanımı, bakteri uyarımı aldıklarında bağışıklık tepkilerini arttırmaktadır [5].

Propolis denilen yapışkan maddeyi kullanan bütün bal arısı ırkları tarafından, propolis kovanların ve peteklerin dezenfekte edilmesinde kullanılmaktadır. Propolis her arı ırkı tarafından değişik miktarlarda toplanır ve biriktirilir [13]. Karniyol arısı (*Apis mellifera carnica*) propolisi çok az toplamaktadır ve kovanlarında bulundurmaktadır, bu yüzden yavru hastalıkları sık görülmektedir [14]. Kafkas arısı (*Apis mellifera caucasica*) tarafından propolis çok toplamaktadır ve kovan girişi propolisle kaplanmaktadır. Bu şekilde kovan girişinde sadece küçük bir delik bırakılır ve dışarıdan giriş bu şekilde kontrol edilmektedir. Ayrıca arı hastalıklarına karşı daha dayanıklı bir ırk olduğu tespit edilmiştir [15].

2.3. Arıların Propolis Toplama Amacı

Koloni halinde yaşamlarını sürdüren bal arıları, kovan içi koşullarının arı topluluğu için sağlıklı olması amacıyla, sıcaklık 34°C ve nem % 40-65 arasında bulunacak şekilde kovanın fiziksel şartlarını korurlar. Bu koşulların sağlanamaması durumunda, kovandaki arılarda virüs, bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalar üremiştir. Bu durum çeşitli arı hastalıklarının ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Propolis kovanda mekanik ve

biyolojik etkisi ile arılar için önemlidir [8]. Kış mevsiminde kovan giriş deliğinin daraltılması, kovan girişinden gelebilecek tehlikelere karşı koloninin savunulması, soğuk havadan, rüzgarın olumsuz etkilerinden korunması için ve çeşitli virüsler, bakteriler, mantarlar gibi mikroorganizmaların üremesinin engellenmesi için arılar tarafından kovanlarında propolis kullanılmaktadır [8]. Ayrıca propolis, kovan içinde peteğin uygun bir yüzeye yapışması ve yüzeye sabitlenmesi için kullanılmaktadır. Bu sayede kovan içinde pürüzsüz ve mikroorganizmalardan arındırılmış bir yüzey oluşturulması sağlanmaktadır [9]. Petek gözlerinin temizlenmesinde propolis kullanılmaktadır. Bu sayede petek gözlerindeki arı yavruları hastalıklardan korunabilmektedir. Propolis ana arının bıraktığı yumurtaların steril bir ortamda gelişmesinde etkili olmaktadır. Ayrıca propolis petek kenarlarının sertleştirilip onarılmasında, kovan sınırlarının şekillendirilmesinde ve çerçeveleri kovan içinde sabitleştirmek için, yarı ve çatlakları kapatmak ve petekleri dezenfekte etmek için kullanılmaktadırlar. Arı kovanlarının içindeki havada mikroorganizmaların bulunma oranının, atmosferdeki havada bulunma oranından çok daha az olmasının sebebi arıların kovana propolis taşımasıdır. Kovana girmeye çalışan karıncaların püskürtülmesi için kovanın iç duvarları propolisle sıvanır, böylece iç duvarlar kayganlaşır. Kovan içinde ölen böceklerin ve diğer canlıların, kovandan çıkarılamayan diğer böcek parçalarının üzeri propolisle kaplanır, böylelikle bu tür organik maddelerin kovandaki arı kolonisine zarar vermeleri engellenmektedir [8].

Benzer şekilde, propolis kovana su girmesini engellemektedir (özellikle yağmurlu günlerde) bu da kovan içi nemin sabit kalmasını sağlamaktadır [9]. Arılar için propolisin hayati önem taşımasının bir sebebi de propolisin antiseptik etkisidir. Arılar koloni halinde yaşadıkları için, enfeksiyonun bir arıdan diğerine yayılması çok hızlı olmaktadır. Bu tür durumların yol açtığı yıkım propolis tarafından önlenmektedir [16].

2.4. Arıların Propolisi Toplaması

Özellikle bal arıları için propolis toplamak uğraştırıcı ve zor işlerden biridir. Propolisin toplanması için özellikle bitkilerin tomurcuk ve sürgünleri tercih edilmektedir ve arılar tarafından buralardan üst çeneleri ile toplanmaktadır. Propolis toplamayı kararlaştırılan arılar tarafından bitkinin tomurcuklu kısmına konulmakta ve bir miktar zamksız sızıntı arka ayakları ve üst çenesi kullanılarak bitkiden kopartılmaktadır. Bu parça arılar tarafından ağızda bir süre çiğnenerek yumuşatılır ve

ağızlarından bazı enzimler eklenerek toplanan parça pelet haline getirilir. Arılar tarafından, ön ve arka bacakların yardımıyla pelet arka bacadaki polen sepetçğine paketlenerek kovana dönülmektedir [8]. Görsel 2.2. de propolis yüklü bal arısı kovana girerken görüntülenmiştir.



Görsel 2.2. *Propolis Yüklü Bal Arısı (Robert Lunsford)*

Kovandaki arılar tarafından pelet halinde getirilen propolis önce çekilerek ısırılır, bir miktar propolis kopararak alınır ve kovan içinde kullanılacak yere bastırılarak yapıştırılır. Propolisi kovanın gerekli yerlerini sıvamak amacıyla kullanılırken çoğu kez propolisin içine bir miktar balmumu karıştırılır [14].



Görsel 2.3. (a) *Arının mum salgılayışı* (b) *Mum kristalleri*

2.5. Propolis Eldesinde Uygunsuzluklar

Kumova vd. (2002), arıların kovanda ihtiyaç duydukları propolisi toplayamadıklarında, çevreden propolis yerine kullanabilecekleri asfalt ve mineral yağlar ve boya benzeri maddeleri toplamak zorunda kaldıklarını, bu tür kirliliklerin ise propolisin farmakolojik amaçlı kullanımını olumsuz etkilediğini ve bu toksik bulaşmaların ürün kalitesini düşürdüğünü belirtmiştir [17].

Arılar tarafından propolis olarak değerlendirilen boya, zift, madeni yağ, cam macunu gibi maddeler propolis yerine kovana taşınmıştır. Örneğin Avustralya'da tarım

makinelerinin dış yüzeyine uygulanan emaye mineralinin kurumadan önce arılar tarafından kazındığı ve kovana taşındığı bildirilmiştir. Arıcılar, arıların cam macunlarını, asfalt yollardaki ziftleri topladığını bildirmişlerdir. Bu tür maddelerin gittikçe artan oranda propolis yerine toplanması propolisin kalitesini düşürmektedir [8].

Ham propolis odun, balmumu, polen hatta ölmüş böcekler ve arılar gibi safsızlıklar içermektedir, bu yüzden ekstraksiyonların hazırlanması öncesinde bu safsızlıkları yok etmek ve safsızlıklardan kurtulmak için örneğe makroskobik bir inceleme yapılması çok önemlidir [10].

Hangi amaçla kullanılırsa kullanılsın, kovandan elde edilen diğer ürünler gibi, propolis de kovanın yerleştirildiği çevre koşullarından olumsuz etkilenmektedir. Bu nedenle çevresel risk faktörlerinin propolisin kullanılmasından önce analiz edilmesi ve endüstriyel kirliliğin sonucu radyoaktif kontaminasyon, , ağır metaller vd. ile tarım ve veteriner ilaçları gibi kirliliklerin bulunmadığından emin olunması gerekmektedir [11]. Tabi ki propolisin elde edildiği kovanların bulunduğu çevrede ve propolis elde edilen bitkilerde pestisit ve ağır metallerin bulunması istenmez ve bu sebeple propolisin çevresel bir kontaminasyon indikatörü olarak kullanılması da önerilmiştir [10].



Görsel 2.4. Kovan girişini kışın daraltmak için farklı çözümler. Arıların üşümesini önlemek için kullanılan malzeme propolise ağır metal bulaşmasına sebep olabilir.

Arıcılar tarafından kovandan propolis toplanırken dikkat edilmesi gereken bazı kriterler bulunmaktadır. Propolis elde edilmesi planlanan kovanlar, endüstriyel kirlilik unsurları olan fabrika atıkları, hava kirliliği, tüm ulaşım hatlarının geçtiği yerlerden uzak alanlara yerleştirilmelidir. Kovanın üretilmesi sırasında malzemeler boyanmamalı, kovan üretilmesinde plastik ve renksiz malzeme, metal malzeme yerine tercih edilmelidir. Propolis toplanmadan önce bal bulaşmış ise arıların balı yemesi ve

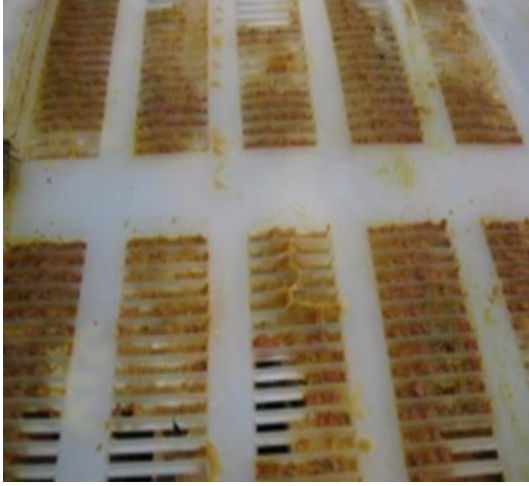
böylelikle bu tür istenmeyen arı ürünlerinin propolisten uzaklaşması sağlanmalıdır. Arıların kullandıkları petek tahtalarında çelik tel kullanılmalı, kovan yapımında iç alanlarda arıların propolis ile kaplamaması için çivi, köşebent kullanılmamalıdır. Arıcılar topladıkları propolisi baskısız kağıt üzerine koymalıdır ve gazete kağıdı gibi uygun olmayan kağıtlar propolis toplamada kullanılmamalıdır. Propolis toplandıktan sonra güneş görmeyen temiz kaplara konulmalı ve bir soğutucuda muhafaza edilmelidir [17].

Arılar propolisi dip tahtası ve uçuş deliği arkasına biriktirdikleri için, içerisine mum kııntısı ve artık maddelerin karışması söz konusudur ve bu nedenle bu bölgelerdeki propolis saf değildir ve insan tüketimi amaçlı toplanmamalıdır [14].

2.6. Uygun Propolis Elde Etme Yöntemleri

Irigotti vd. tarafından fonksiyonel bir gıda bileşeni olarak propolisin kullanılması hakkında yapılan çalışmada, propolisin antioksidan içeriği ve biyolojik aktivitesini değerlendirmek amacıyla propolisin kimyasal bileşimini araştırmanın çok önemli olduğu vurgulanmıştır. Kimyasal bileşimlerini incelemek üzere elde edilen propolis örneklerinin çeşit çeşit maddeler içermesi ihtimalinin; hasat mevsimi, propolisin hasat edildiği coğrafi bölge ve bu bölgenin botanik yapısı, bal arılarının türü, hasat yöntemi, hasat sonrası ham propolisin işlenmesine dayandığı tespit edilmiştir. Arıcıların propolisi elde etmesi ve kovandan hasat etmesi tıpkı bir zanaatkar işi gibi el yapımı ve tecrübe ve bilgi gerektiren bir iştir. Bu yüzden, hasat etme şekli sebebiyle yanlışlıkla farklı bulaşanlarla birlikte hasat edilen ham propolis kalitesinde farklılıklar olabilmektedir. Propolisin aynı zamanda arıcılık faaliyetleri sebebiyle olası antibiyotik kalıntıları, pestisitleri ve hatta ağır metalleri içermemesi gerekmektedir. Sonuç olarak tüm arıcılık faaliyeti yürütülen ülkelerde arıcılık mevzuatını belirleyenlerin ve düzenleyici kuruluşlar tarafından ham propolis hakkında bir kalite standardı yayımlanması, kaliteli propolis eldesinde çok önem taşımaktadır[27]. Arıcıların kovanlardan propolisi en temiz toplama metodu, kovanların üzerine propolis tuzaklarının konulması ve buradan elde edilen propolisin toplanmasıdır. Tuzaklar (traplar), küçük delikleri olan levhalardır ve bu delikler altında arılar için kovandaki küçük çatlaklar olarak algılanmaktadır. Arılar tarafından kovanların üst kısmına yerleştirilen bu tuzaklardaki delikler dış etkilerden korunmak için kapatılmaya çalışmakta ve tuzaktaki delikler propolisle doldurulmaktadır. Tuzaklar sayesinde propolis hasadı sırasında kontaminasyon

meydana gelmemektedir. Havalar iyice soğuyuncaya kadar, propolis üretimini arttırmak için, kovanın üstündeki örtü tahtası alınarak, üzerinde arıların geçemeyeceği genişlikte (3 mm) açıklıklar bulunan tuzaklar yerleştirilmektedir.



(a)



(b)

Görsel 2.5. a) Tuzak kullanılarak propolis toplanması b) Kovanda biriken propolisler

Tuzakların üzerinde bulunan açıklıklar sonbahara kadar işçi arılar tarafından propolis ile kapatılmaktadır [8]. Propolis ile kapatılan deliklerin bulunduğu tuzak, arıcılar tarafından kovanın üst kısmından alınarak derin dondurucuya konulur. Derin dondurucuda sertleşen tuzaktaki propolis kırılğan bir hal alır ve tuzağa uygulanan basit bir hareket ile propolis tuzaktan ayrılır [8].



(a)



(b)

Görsel 2.6. Brezilya'da arıcıların kullandığı propolis tuzağı(a) Kovan kutusunun yan tarafları çıkarılabilen tahta çitelerden oluşmaktadır ve 4cm.lik boşluklar bulunmaktadır. (b)Bu çiteler propolisle dolunca propolis hasadı için bir kere çıkarılır. Propolis bulunan tahta bıçakla kazınır. Bal arıları propolis içeren levhada kendiliklerinden delikler bırakmaktadır.



Görsel 2.7. Kovanın iç duvarlarındaki tuzaklar. İç duvarlarına zımbalanarak tutturulan propolis tuzakları ile bir propolis zarfı oluşturulması amaçlanmıştır (R- Borba)

Ham propolisin kimyasal bileşimi ve biyolojik aktiviteleri bitki türü kaynağına, arı türüne, iklim özellikleri gibi çevresel faktörlere, propolisin hasat zamanı ve tekniğine göre, hatta kullanılan ekstraksiyon sıvısı ve metoduna göre değişkenlik göstermektedir [18].

Freitas vd. tarafından dört yıl boyunca aynı arılıktan toplanan propolis örneklerinin biyoaktiviteleri hakkında çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada, artarda gelen dört yıl boyunca propolis örnekleri toplanmıştır. Diğer çalışmalarda araştırılan propolislerin çoğundan farklı olarak, arıcılar tarafından taşınabilen kovanlardan değil, belirli bir yerdeki kovanlardan elde edilen (Gerês) propolis araştırmada kullanılmıştır. Ayrıca arı kovanının yıllık temizliği sırasında kovandan kazınarak propolis elde etme gibi sıradan bir yöntemden ziyade, propolis elde etmek için özel tuzaklardan (ızgara şeklinde) faydalanılmıştır. Arıcı kovanların üst kapağının altına ızgaraları yerleştirmiştir, böylece arılar tarafından kovanda açıklık varmış gibi zannedilerek bu açıklıkları propolis ile doldurmaları sağlanmıştır. Örnekler birbirini takip eden dört yılda toplanmıştır. Her ne kadar farklı yıllarda toplanmış olsalar da propolis ekstraktlarının belirgin kimyasal özellikleri (fenolik bileşenlerin türü ile ilgili) çok büyük benzerlik göstermiştir, ancak miktar olarak değişkenlikler görülmüştür. Bu da propolis ekstraktlarının biyoaktivite profilleri arasındaki büyük benzerliği desteklemektedir [18]. Yapılan araştırmalar göstermiştir ki, propolisin nitel ve nicel özellikleri hep değişkenlik gösterebilmektedir. Bu çalışmada üst üste dört yıl elde edilen propolis örneklerinin kimyasal özelliklerinin

benzer olması; standartlaştırılmış hasat ve toplama yöntemi, korunmuş bir alanda bulunan arılığın çevresinde bulunan bitki örtüsünün aynı olması ile açıklanabilir. Bu çalışma tanımlanmış bir üretim ve toplamanın önemini ortaya koyan güzel bir örnektir [18].

2.7. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolis en ilginç bitki-böcek etkileşimlerinden birinin sonucunda elde edilmektedir. Bütün dünyadaki çeşitli arı ve bitki türleri bu doğal ürünün üretiminde etkilidir [19]. Propolisin biyolojik aktivitesi bölgeden bölgeye değişkenlik göstermektedir. Propolisin rengi ve içeriği, bitki kaynağı ve kovanın bulunduğu bölgeye göre değişmektedir [16]. Propolisin rengi sarı, yeşil, kırmızı, kahverenginin farklı tonlarında görülebilmektedir ve bu durum başlıca kavak, huş ağacı, karaağaç, gürgen (kızılağaç), kayın, at kestanesi, imza çiçeği ve çam gibi kozalaklı ağaç türlerinden kaynaklanmaktadır [20]. Propolis örnekleri eğer ılıman bölgelerdeki kovanlardan toplanmışsa neredeyse belirgin bir kahverengi rengindedir. Propolisin rengi, tropik iklime sahip ülkelerde ve Avustralya'da siyahtır. Farklı ülkelerde kovanlardan toplanan propolis turuncu ve menekşe renklerinde olabilmektedir. Propolis kovandan alındığında yapışkan özelliktedir ve propolisin kokusu keskin ve ayırtedicidir [8].



Görsel 2.8. Kahverengi ve sarı propolis örnekleri

Propolis 15°C'nin altında muhafaza edilmekte ise sert ve kırılğan bir yapıdadır. Propolis 25-45 °C'de muhafaza edildiğinde yumuşak ve yapışkan, 60-70°C'de muhafaza edildiğinde ise sıvı bir hal almaktadır [11]. Yüksek sıcaklıklarda özellikle tropikal bölgelerde kısmi erimenin önlenmesi ve propolisin özelliklerini koruyabilmesi amacıyla propolis muhafazası için soğutucu dolapların kullanılması gerekmektedir.

Propolis derin dondurucuda muhafaza edilmelidir ve katı olarak soğutucudan çıkarıldığında işlenmeden önce kolaylıkla öğütülebilmektedir [8].

2.8. Propolisin Kimyasal Özellikleri

Yapılan çalışmalarda propolisin farklı kimyasal bileşikler içerdiği tespit edilmiştir. Bunlar; uçucu organik bileşikler, flavonoid aglikonlar, fenolik asitler ve bunların esterleri, fenolik aldehytler, alkoller ve ketonlar, seskiterpenler, kuinonlar, kumarinler, steroidler ve aminoasitlerdir. Kovanın bulunduğu çevredeki bitki örtüsü, bölgenin iklim ve coğrafi özellikleri, bal arısının türü, botanik ve coğrafi faktörlere dayalı olarak propolisin kimyasal bileşimi değişkendir ve karmaşıktır. Propolisin biyoaktivitesinin değişken olmasının kimyasal içeriğinin değişken olmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bankova vd. tarafından ılıman bölgelerden elde edilen propolisin (poplar) başlıca fenolikleri, flavonoid aglikon, aromatik asitleri ve bunların esterlerini içerdiğini belirtilmiştir. Diğer taraftan tropikal bölgelerden elde edilen propolis farklı fenolikleri; prenilate ρ -kumarik asit türevleri, flavonoidler, benzofenonlar, lignanlar ve terpenleri içermektedir. Araştırmalar sonucu elde edilen bu bilgiler coğrafi faktörlerin ve bitki örtüsünün propolisin kimyasal bileşimine etkisinin olduğunu göstermektedir [21]. Propolisin bileşimi farklı faktörlere bağlı olarak değişkendir, ama genel olarak Tablo-1’de gösterildiği gibi reçine, balmumu, aromatik yağlar, polen ve diğer organik maddelerden oluşmaktadır [21].

Tablo 2.8. *Propolisin genel yapısı [8].*

Propolisin Bileşimi	Oran (%)
Reçine ve Zamksı Maddeler	50
Bitkisel Mumlar	30
Esansiyel Yağlar	10
Polen	5
Organik Bileşikler ve Mineral Maddeler	5

Bankova(2005), propolisin kimyasal bileşimi ve botanik kaynaklarının detaylı araştırılmasını ve buna dayandırılarak biyolojik özelliklerinin tanımlanması gerektiğini vurgulamıştır [10].Arılar propolisi tek bir bitkiden toplamadıkları için, bileşiminde tek çeşit salgı yer almamaktadır. Arılar propolisi farklı farklı bitkilerden toplamaktadır. Bu

nedenle propolis tipi, bileşiminde en yüksek oranda bulunan başlıca bitkiye göre isimlendirilmektedir [11]. Propolis kaynağı olan başlıca bitki türleri; *Acer* spp. (Akçaağaç), *Corylus* spp. (Fındık), *Quercus* spp. (Meşe), *Alnus* spp. (Kızıl ağaç), *Prunus* spp. (Erik), *Ulmus* spp. (Karaağaç), *Salix* spp. (Söğüt), *Aesculus hippocastanum* (At kestanesi), *Pinus* spp. (Çam), *Eucalyptus* spp. (Ökalyptus), *Castanea* spp. (Kestane), *Betula* spp. (Huş), *Populus* spp.(Kavak), *Tilia* spp. (Ihlamur), ve *Flaxinus* spp. (Dişbudak)'tır.

Brezilya propolisi GC-MS ile analiz edilmiştir ve yapılan analizler sonucunda Brezilya propolisinin kaynağının *Baccharis drancunculifolia* bitkisi olduğu tespit edilmiştir. Bitkisel orijini bilinen propolis toplandıktan sonra kimyasal olarak kolaylıkla standartlaştırılmaktadır [8].

3. PROPOLİS VE STANDARDİZASYON

Bankova (2005), farklı bitkisel kaynaklardan elde edilen propolislerin farklı kimyasının tespit edilmesi sebebiyle, biyolojik özelliklerinin de birbiriyle benzer olamayacağı beklentisinin olduğunu kaydetmiştir. Propolis arıların enfeksiyona karşı savunmasıdır ve antibakteriyel ve antifungal etkileri Avrupa'da elde edilen propolis için çoğunlukla flavononlar flavonlar, fenolik asitler ve onların esterleri sayesindeyken, Brezilya'da elde edilen propolis için bu etkiler prenilate ρ -kumarik asitler ve diterpenler sayesindeyken. Gerçek şu ki, farklı kimyasal yapının aynı tür (antimikrobiyal) etkiye neden olması ve hatta bazı durumlarda aynı oranda etkiye neden olması şaşırtıcıdır. Propolis için genel bir kimyasal standardizasyon imkansız görülmektedir ve bu yüzden, propolis bileşiminin, botanik kökeninin ve biyolojik özelliklerinin detaylı bir şekilde araştırılması çok önemlidir [7].

Propolis (arı tutkalı) bitkilerden elde edilen bir üründür ve arıların propolisi elde ettikleri süreçte bitkilerden taşıdıkları maddeleri kimyasal olarak bir değişime uğratmadıkları ispatlanmıştır. Bu durumda tıbbi bitkiler için bulunan çözüme benzer şekilde, propolisin standartlaştırılması sorununa yaklaşmak tamamen uygun olacaktır. Tıbbi bitkiler ve onlardan elde edilen ekstraktlarda kalite için uygun miktar açısından kriter oluşturmak için, etkili bileşenler hakkında var olan bilgilere dayanarak farklı yöntemler izlenmelidir. Eğer etkili bileşenler biliniyorsa ve kabul edilmişse, uygun bir analitik metod kullanılarak miktar ölçülmelidir. Eğer etkili bileşenler bilinmiyorsa veya

hala bu konuda görüşlerde belirginlik yoksa ekstrenin tümü “etkili bileşen” kabul edilir ve bu durumda kalite kontrol için belirleyici bileşenler kullanılmalıdır. Propolis ile ilgili standardizasyon sorununda, şimdiye kadar pek çok bilgi toplanmıştır ve en önemli etken bileşenlerden birinin CAPE (kafeik asit fenil ester) olduğu bulunmuştur. Ancak tropikal bölgelerden elde edilen propolis örnekleri CAPE’den eser miktarda bile içermezken, propolis standardizasyonu için CAPE nasıl etken bileşen olarak kullanılabilir? Aynı durum diğer pek çok etken propolis içerikleri için de geçerlidir. Bu durumda, propolis gibi değişken bir ürün için etkili kimyasal standardizasyon mümkün görülmemektedir [12].

Ancak eğer farklı propolis türleri bitki kaynaklarına ve buna karşılık gelen kimyasal bileşime göre kesin ve açık olarak tanımlanırsa, bir standardizasyon ihtimali bulunmaktadır. Bitki kaynağının bileşimi, propolisin kimyasal bileşimini belirlemektedir ve etkili bileşenlerin bilgisi ile birleştiğinde standardizasyon ve kalite kontrolün ipuçlarını vererek, belirli kimyasal bileşime sahip propolis türlerinin standart özelliklerinin belirtilmesi sağlanmaktadır [12].

Bir bitki türünün genomu bu bitki türünün ayırt edici özelliğidir ve genom, bitki enzimleri tarafından sentezlenen ikincil metabolitleri belirler ve biyolojik faaliyetlerden sorumludur. Propolis aynı zamanda ikincil bitki metabolitlerini içermektedir fakat bunların tüm dünyada aynı olmadığı tespit edilmiştir [10].

Son yirmi yıldır propolisin biyolojik özelliklerini farklı açılardan inceleyen çok sayıda araştırma yayımlanmıştır. Bununla birlikte, ne kadar “güçlü”, “kayda değer” veya “belirgin” etkinlikler kaydedilmiş olsa da bu araştırmaların önemli bir bölümü sınırlı oranda faydalı bulunmuştur. Sebebi, karşılaştırma ve sonuçların bilimsel değerlendirmesi için temelden yoksun olmalarıdır. Çünkü çalışmalarda propolis örneklerinin kimyasal doğasından, nereden elde edildiğinden hiç bahsedilmemiştir. Bu çalışmalar sadece propolis ekstreleri ile analiz gerçekleştirildiğini kaydetmektedir. Ancak şunu belirtmek gerekir ki doğada hazır halde saf “propolis” diye bir şey bulunmamaktadır [10].

Yapılan araştırmalar sonucunda bazı propolis kimyasal türleri mevcut olduğu tespit edilmiştir ve belirli bitki kaynaklarına göre propolis türleri Tablo 2’de listelenmiştir [10].

Propolis Türü	Coğrafi Orijin	Bitki Kaynağı	Bileşenler
Poplar	Avrupa, Kuzey Amerika, Asya'nın Tropik olmayan bölgeleri, Yeni Zelandada	<i>Populus</i> spp. section <i>Aigeiros</i> , <i>P. nigra</i> L.	Flavonlar, flavanonlar, sinnamik asitler ve bunların esterleri
Yeşil(alecrim) Brezilya	Brezilya	<i>Baccharis</i> spp., baskın olarak <i>B. dracunculifolia</i> DC.	Prenylated p-kumarik asit, diterpenik asit
Huş ağacından elde edilen türü	Rusya	<i>Betula verrucosa</i> Ehrh.	Flavonlar ve flavonoller(Poplar türünde olduğu şekilde değil)
Kırmızı propolis	Küba, Brezilya, Meksika	<i>Dalbergia</i> spp.	Isoflavonoidler (isovlavan, pterokarpan)
Akdeniz	Sicilya, Yunanistan, Girit, Malta,	<i>Cupressaceae</i> (Türleri tanımlanmamıştır)	Diterpenler(başlıca labdane türü asitler)
"Clusia"	Küba, Venezuela	<i>Clusia</i> spp.	Polyprenylate benzofenonlar
"Pacifik"	Pasifik Bölgesi (Okinawa, Tayvan, Endonezya)	<i>Macaranga tanarius</i>	C-Prenyl-flavanonlar

Tablo 3.1. En Yaygın Propolis Türlerinin Bitki Orjini ve Başlıca İçerikleri [10].

Bu tabloda, standardizasyon ve kalite kontrol proseslerinde belirgin farklılıklar olarak kabul edilmesi gereken propolisin kimyasal türleri tanımlanmıştır. Önemle hatırlatılması gerekir ki bu propolis türlerinden birinin biyolojik aktivitesini içeren sonuçlar, asla bir diğer propolis türü için de olduğu gibi geçerlidir şeklinde kabul edilip araştırmalarda kullanılmamalıdır [12].

Propolis preparasyonlarını (müstahzarlarını) üreten işletmeler, propolis hakkında herhangi bir biyolojik çalışma yapan araştırmacılar, bilim insanları ve tüm propolis kullanıcılarının, üzerinde çalıştıkları propolisin türünü ayırt etmeleri ve tür hakkında bilgi sahibi olmaları gerekmektedir. Bankova (2005) tarafından propolisin içerdiği toplam fenolik madde yüzdesinin biyolojik aktiviteyle daha ilişkili olduğu belirtilmiştir ve toplam fenolik yüzdesinin bilinmesinin, fenolik maddelerin bileşenlerinin tek tek niceliklerinin belirlenmesinden daha bilgilendirici ve aydınlatıcı olduğu kaydedilmiştir. Sonuç olarak tek tek bileşenlerin konsantrasyonlarının ölçülmesi yerine, aktif bileşik

gruplarının toplam konsantrasyonunun ölçülmesinin propolis çalışmalarında doğru yaklaşım olacağı belirtilmiştir [12].

Propolis araştırmalarında dikkati çeken bir diğer husus ise, biyolojik etkinliğe sahip olduğu belirlenen bileşenlerin propolisin içerisinden ayrıştırılması ile söz konusu etkinin dikkat çekici şekilde zayıfladığının bildirilmesidir. Bu sonuç, propolis içerisindeki bileşenlerin birbirlerinin etkilerini destekleyecek şekilde sinerjistik etkileştiğini göstermiştir [11].

Irigotti vd. propolis ekstralarını hazırlamak için bir analitik yöntemin standardize edilmesinin önemini vurgulamıştır. Bu şekilde propolisin bileşenlerine göre doğru bir şekilde sınıflandırılmasının ve bu sayede ticari olarak değerinin belirlenmesinin mümkün olacağı belirtilmiştir [27].

3.1. Propolisin Yapısındaki Polifenoller

Kimyasal olarak propoliste toplam 300 farklı bileşen tanımlanmıştır. Genel olarak propolisin, polifenol (flavonoidler, fenolik asitler ve esterler), fenolik aldehytler ve ketonlar, vb. içerdiği kaydedilmiştir [9]. Flavonoidler bitkilerde tohumlarda, meyvelerde bulunurlar ve bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanmaktadır [22]. Fenolik bileşenler ve polifenoller, bir benzen halkasına bağlanan bir veya çoklu hidroksil gruplarını içermektedir. Polifenoller basitten, yüksek oranda polimerize bileşen içerenlerine kadar değişen kimyasal yapılarına dayanarak farklı sınıflara ayrılabilir. Flavonoidler birbirine merkezi bir üçlü karbon zinciriyle bağlı iki benzen halkalı yapıya sahiptir ve 15 karbon atomu içeren 2-fenil benzopiran (difenilpropan) yapısı C6-C3-C6 temel karbon iskeleti gösterilmektedir. Farklı yerleşim ve substitüent ile temel karbon iskeletinde değişiklikler ile flavonoidler, flavonoller, flavonlar, izoflavonlar oluşmaktadır [51]. Polifenollerin temel fizyolojik fonksiyonları bitkilerin büyüme ve üremesiyle ilgilidir ve aynı zamanda patojenik organizmalar ve ultraviyole radyasyona karşı koruyucudur. Bunlara ek olarak polifenoller gıdaların renk ve tat gibi duygusal özelliklerini de büyük ölçüde etkilemektedir [23].

Her ne kadar polifenollerin insan diyetinin yaygın bileşenlerinden olduğu bilinse de; yapılan araştırmalar polifenollerin günlük toplam diyetin %1-5'i arasındaki

konsantrasyonlarda alınması durumunda, biyolojik aktiviteleri sebebiyle insanlarda toksik etkiye sebep olabildiğini göstermiştir [23].

Polifenoller çoğunlukla dört ana grupta sınıflandırılmaktadırlar; fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler ve lignanlar. Polifenollerin temel kimyasal yapısı ve bunlara örnek olarak gösterilebilecek bileşenler Tablo 3’te sınıflandırılarak gösterilmiştir [23].

Flavonoidler; flavonoller, flavanoller, antosiyaninler, isoflavonoidler, flavanonlar ve flavonlardan oluşan bileşiklerin antioksidan grubudur. Bileşiklerin bütün bu alt yapıları aynı difenil propan ($C_6H_3C_6$) iskeletine sahiptir. Flavonoidlere antioksidan özelliklerinin verilmesinin sebebi, halka şeklindeki yapısına bağlanan fenolik hidroksil gruplarıdır ve indirgen madde, donatör hidrojen, tekli oksijen söndürücü, hiperoksit radikal süpürücü ve hatta metal iyonlarını bağlayan moleküller gibi davrandıkları belirtilmiştir. Fenolik asitler hidroksisünamik asit ve hidroksibenzoik asitten oluşmaktadır. Metal iyonlarını bağlayan moleküller (şelat ajanı) gibi antioksidan etkileri bulunmaktadır ve serbest radikal süpürücülerdir. Hidroksi benzoik gruptaki en çok üzerinde araştırma yapılan bileşik, gallik asittir ve hidroksisünamik asitlerin öncüsü de sünamik asittir [24].

3.2. Propolisin Fizyolojik Etkileri

Flavonoidlerin farmakolojik özellikleri antimikrobiyel, antioksidan, antienflamatuar ve antiviral fonksiyonları içermektedir [22]. Flavonollerin antioksidan etkisi bu bileşiklerin biyolojik önemlerini belirgin şekilde arttıran başlıca etken olarak kaydedilmiştir. Serbest radikallerin belirgin miktarda artmasının kronik hastalıkların oluşmasında ve yaşlanmada önemli ölçüde payı olduğu tespit edilmiştir. Serbest radikallerdeki artış, oksidatif stresin baskın olduğu belirli bir fizyolojik durum oluşturarak organizmanın sağlığında ciddi problemlere sebep olmaktadır. Antioksidan etkisiyle flavonollerin oksidatif zararı azaltarak önemli bir rol oynadıkları ve bu kronik hastalıkların şiddetini azaltmada yardımcı oldukları tespit edilmiştir. Flavonollerin antiviral potansiyeline ilişkin yapılan çalışmalarda, influenza virüsüne karşı en etkili doğal bileşiklerin kuersetin ve klorojenik asit olduğu kaydedilmiştir. Yapılan araştırmalarda SARS-CoV-2 virüsünün sebep olduğu COVID-19’un tedavisi ve önlenmesinde kuersetinin etkisi incelenmiştir. Kuersetin prelinik çalışmalarda

bağışıklık sistemini düzenleyici ve antimikrobiyel etki göstermiştir ve bir çalışmada üst solunum yolu enfeksiyonu etkisinde azalma kaydedilmiştir [25].

Tablo 3.2. Yapılarına Göre Sınıflandırılmış Polifenollerin Listesi [23].

Sınıf	Süstitüsyon	Örnekler	Yapı
Fenolik Asit	R1:H, OH, OCH ₃	<i>Gallik asit</i>	
Hidroksibenzoik asit	R2: H, OH, OCH ₃	<i>Vanilik asit</i>	
	R1:H, OH, OCH ₃	<i>Kafeik asit</i>	
		<i>Ferrulik asit</i>	
Hidroksisinnamik Asit	R2: H,OH,OCH ₃	<i>Kumarik asit</i>	
		<i>Rosmarinik asit</i>	
Flavonoidler	R1:H, OH	<i>Hesperidin</i>	
Flavonoller	R2: H,OH	<i>Naringin</i>	
Flavonlar	R3: H,OH	<i>Kersetin</i>	
Flavanonlar	R4: H, OH	<i>Kamferol</i>	
	R5: OH, OCH ₃	<i>Luteolin</i>	
Antosiyanidinler	R1:H,OH	<i>Siyanidin</i>	
	R2: OH,OCH ₃	<i>Pelargonidin</i>	
Kateşinler	R1-R3:OH	<i>Kateşin</i>	
	R4:H,OH	<i>Epikateşin</i>	
	R5:OH	<i>Epigallokateşin</i>	
İzoflavonlar	R1:OH	<i>Genistein</i>	
	R2-R3:H, OH	<i>Daidzein</i>	
Kalkonlar	R1-R5:H, OH	<i>Ksantohumul</i>	
		<i>Floretin</i>	
		<i>İzosalipurpurin</i>	
Lignanlar	R1-R2:H, OH	<i>Enterodiol</i>	
		<i>Mateiresinol</i>	
Stilbenler	R1-R4:H, OH, OCH ₃	<i>Resveratrol</i>	
	R5:H,OH	<i>Piseatannol</i>	

Yapılarına dayanarak, flavonollerin akciğer, göğüs ve kolon rektal kanserlerinde bulunan bazı moleküler hedeflerin, enzimatik aktivitelerinde değişiklik yaptıkları kaydedilmiştir. Flavonollerin antikanser etkilerini çok çeşitli uyguladıkları anlaşılmıştır: reaktif oksijen türlerinin (ROS) süpürücü enzimatik aktivitelerini ve hücre döngülerini ayarladıkları, otofaji ve apoptozu boşalttıkları, kanser hücresinin çoğalmasını ve yayılmasını baskıladıkları tespit edilmiştir [25].

Propolis ile yapılan diğer laboratuvar araştırmalarında propolisin; antiseptik, antiinflamatuvar, antioksidan, antibakteriyel, antimikotik, antifungal, natiülser, antikanser, yara iyileştirici ve bağışıklığı düzenleyici özellikler gibi pek çok biyolojik etkinliğe sahip olduğu kaydedilmiştir [26].

3.3. Propolis Ekstraksiyonuna Hazırlık

Arılar tarafından tuzaklar ham propolisle kaplandıktan sonra arıcılar tarafından kovanların üst bölümüne yerleştirilen tuzakların kovandan alınarak soğutucuya konulması propolisin muhafazası için en uygun yöntem olarak tanımlanmıştır. Özellikle derin dondurucularda muhafaza edilen propolisin kolaylıkla tuzaktan ayrıldığı kaydedilmiştir [8].

Özkök vd. (2021) Türkiye'nin değişik bölgelerinden toplanan 23 propolis örneğinin toplam fenolik bileşen içeriğini ve toplam antioksidan kapasitesini belirlemek için yaptıkları çalışmada, propolis tuzaklarının bahar döneminde kovanlara yerleştirildiğini ve yaz sonunda tuzakların alındığını belirtmiştir. Propolis tuzakları toplandıktan sonra arıcılardan tuzaklarla temin edilen propolisin derin dondurucuda muhafaza edildiği ve araştırmalarında kullanılan propolis ekstraktları hazırlama öncesinde derin dondurucudan çıkarıldığı belirtilmiştir [28].

3.4. Ekstraksiyon Çözücüsünün Etkisi

Kovandan toplanan ham propolis fiziksel özelliklerinden dolayı ve istenmeyen yabancı maddeler içerebildiği için bu şekliyle kullanılamaz. Propolisin ekstrakte edilmesinde kullanılan çözücü, polifenollerin elde edilmesi ve istenmeyen maddelerin uzaklaştırılması için oldukça önemlidir. Yapılan araştırmalarda propolis ekstraktlarının çoğunlukla etanol ile hazırlandığında daha çok polifenolün çözücüye geçtiği kaydedilmiştir. Bununla birlikte ekstraksiyon amaçlı; su, kloroform, dimetilsülfoksit,

metanol, eter, aseton, diklorometan, etil asetat ve propilen glikol gibi çözücülerin yanında sirke, laktik asit de kullanılmıştır [27]. Yapılan bilimsel çalışmalarda, analitik ve biyolojik etkinlik bulguların, propolisin çözüldürüldüğü çözücü tipine göre de değişim gösterdiği kaydedilmiştir [11].

Propolis ekstraksiyon metodları son ürün özelliklerini etkileyebilmektedir çünkü farklı çözücüler farklı bileşenleri çözmekte ve ekstrakte etmektedir. Analitik çalışmalarda en çok sıklıkla kullanılan ekstrelerin etanol ekstreleri olduğu, farklı konsantrasyonlarda ise metanol ve suyun çözücü olarak kullanıldığı kaydedilmiştir [7]. Propolis su ekstraksiyonu, her ne kadar düşük maliyet ve kimyasal ekstraksiyonun etanol içermemesi gibi avantajlara sahip olsa da nadiren kullanılmaktadır [27]. En yaygın şekilde kullanılan propolis etanolik ekstrenin, dondurucuda muhafaza edilen ham propolisin bir öğütücüde öğütülerek toz haline getirilmesi, etanolde çözüldürülmesi, çözünürlük hızının artırılması için belli bir süre karıştırılması ve filtrasyon adımları uygulanarak elde edildiği kaydedilmiştir [28]. Farklı konsantrasyonlarda alkol farklı bileşenleri ekstrakte eder ve farklı alkol konsantrasyonlarının çözücü olarak kullanıldığı ekstraksiyon basamakları sonrasında elde edilen kurutulmuş ekstrelerin çözünürlüğü konsantrasyon farklılıklarından etkilenmektedir. Bu yüzden daha yüksek konsantrasyonlarda alkolle yapılan ekstreler kurutulduklarında genellikle organik çözücülerde ve yağlarda çözünürler. Fakat çok düşük konsantrasyonlu etanol ile ekstraksiyon sonrası kurutulmuş ekstrelerin suda çözünürlükleri daha fazladır. Birleşmiş Devletlere yapılan ilk patent başvurusunda Sosnowski (1983) tarafından propolisin %10-25 alkolle yapılan ekstrelerinden kurutulmuş filtratların tamamıyla suda çözünür olduğu tanımlanmıştır [52].

Propolis ekstraksiyonunda; çözücü seçimi, örnek-çözücü konsantrasyonları, ultrason yönteminin ekstraksiyonda uygulaması, sıcaklık uygulanması ve karıştırma işlemi ile ekstraksiyon süresinin kısaltılması gibi etkenlerin belirlenmesiyle ekstraksiyon işlemi basamaklarının tanımlanması mümkün olacaktır [29].

3.5. Propolis Ekstraksiyon Yöntemleri ve Verimlilikleri

Ekstraksiyon (çekme) homojen bir karışımdan bir (veya bir grup) maddeyi ayırmak için uygulanan işlemdir. Bu işlem hem organik fazda hem de su fazında çözünebilir bileşiklerin, sulu fazdan organik faza aktarılması için yapılmaktadır. Bu

işlemede yararlanılan temel prensip, organik faza çekilmesi istenen maddenin, su ve organik fazlardaki çözünürlüğü doğrultusunda bir dağılım göstermesidir [30].

Propolisin aktif bileşenlerinin ekstraksiyonu için farklı çözücüler kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Özellikle propolisin kalite kriteri olarak belirlenen polifenollerin ve flavonoidlerin ekstraksiyonunda çok etkili olduğu için, bu çözücüler arasında en çok kullanılanı etanol/su (70/30) karışımıdır. Çözücünün miktarı ve türü, ekstraksiyon sıcaklığı ve süresi ve hatta ham propolisi işleme prosedürü biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunu etkileyen kriterler olarak belirtilmiştir [47].

3.6. Propolis Klasik Ekstraksiyon Yöntemleri

Ekstraksiyon, bitkilerden ve bitki kaynaklı bileşiklerden biyoaktif bileşenlerin ayrılması ve tanımlanması için temel bir proses olarak tanımlanmıştır. Ekstraksiyon yöntemiyle gerçek matriks, takip eden analitik prosedürle uygun örneğe dönüştürülmektedir. Eski zamanlardan beri dünyada çeşitli etnik gruplar tarafından bitkilerden ve bitkilerin terapötik etkilerinden yararlanmak için; kaynatma, maserasyon, infüzyon (demleme), parçalama (sindirim) ve perkolasyon (sızma, süzme) metodları, hazırlanan numunelere uygulanmıştır. Modernizasyon ve endüstriyel büyümenin olduğu 18. yy.da ekstraksiyon tekniği geliştirilerek “Soxhlet Ekstraksiyonu” tanımlanmıştır ve bu teknik, parçalama sindirim ve kaynatma yöntemlerinden geliştirilmiştir. Bununla birlikte soxhlet yöntemi de dahil bu konvansiyonel ekstraksiyon tekniklerinde büyük miktarda çözücü kullanıldığı, ekstraksiyon sürelerinin uzun olduğu ve daha az verimli (ekstrakte edilen miktarın az olması) olduğu için bazı dezavantajlarının bulunduğu kaydedilmiştir [31].

Liao vd.’nin (2021) propolis su (PWE) ve propolis etanol (PEE) ekstratlarının etkinliğini değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada, propolis örneği %96’lık etanolde ekstrakte edildikten ve 25 kHz’de 45 dakika ultrasonik banyoda tutulduktan sonra oda sıcaklığında filtre edilmiştir. PWE ekstraksiyonu ise 80 °C’deki suda ekstraksiyon hazırlandıktan ve 12 saat bekletilip, 20 kHz de 45 dakika ultrasonik banyoda tutulduktan sonra oda sıcaklığına soğutulup filtre edilmiştir [32].

Yapılan çalışma sonunda etanol ektratından %19,87 verim alınırken, su ektratında %13,11 verim alınmıştır. Toplam fenolik madde miktarı (μg Gallik asit eşdeğeri/mg) etanol ektratında 151,54 iken su ektratında 20,05 olarak tespit edilmiştir.

Toplam flavonoid ($\mu\text{g}/\text{mg}$) etanol ekstratında 70,05 iken su ekstratında 14,62 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak etanol ile ekstraksiyon yöntemiyle daha yüksek miktarda polifenol bileşenlerin çözüldüğü tespit edilmiştir [32].

Cunha vd. (2004) tarafından, bazı etkenlerin propolis ekstratlarının fenolik bileşimine ve ekstre verimine etkilerinin incelendiği araştırmalarının sonucunda; farklı oranda etanol çözücülerini kullanılarak (%30, %50, %70, %100) oluşturulan propolis ekstraksiyonları kıyaslandığında, en yüksek verimin %70 etanol çözücüsü ile elde edildiği tespit edilmiştir. Ekstraksiyondaki çözücüyü yenilemenin propolis ekstraksiyonunun verimliliğine etkisi araştırıldığında, çözücü doygunluğunun sınırlandırıcı bir faktör olmadığı ve propolis ekstraksiyon verimliliğinin artmadığı tespit edilmiştir [33].

3.7. Gelişmiş Ekstraksiyon Yöntemleri

Son yıllarda gelişmiş ekstraksiyon tekniklerine artan bir talep olmuştur. Bunun nedeni, otomasyona uygun olması, ekstraksiyon zamanının kısalması, organik çözücü tüketiminin azalması ve örnek hazırlama maliyetindeki azalmadır [34].

Yeni teknolojilerin gelişimine paralel olarak, ekstraksiyon prensiplerinin temel anlayışı da ilerlemiştir. Bu ilerleme örnek hazırlamada yeni yönelimlere yol açmıştır. Bunlar mikroekstraksiyon, minyatürleşme ve analitik işlemlerde kullanılan örnekleme, ayırma ve kantitasyon basamaklarının entegrasyonu olarak belirtilmiştir. Bu yüzden örnek hazırlamada, klasik ekstraksiyon tekniklerinin yerini mikrodalga destekli ekstraksiyon, süperkritik sıvı ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyonu (veya hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu), sonikasyon destekli sıvı ekstraksiyonu gibi teknikler almıştır. Bu teknikler arasındaki benzerlik, ekstraksiyon yönteminin hızını önemli ölçüde artırması, yüksek sıcaklık ve basınçla çalışma olasılığının elde edilmesidir [34].

Bu tekniklerin toksik organik çözücülerin kullanımını en aza indirdiği ve ekstraksiyon zamanını, proses sıcaklığını ve enerji tüketimini azalttığı kaydedilmiştir. Bu tekniklerin kütle transferini ve ekstraksiyon verimliliğini arttırdığı ve fitokompleks bütünlüğünü, özellikle ısıya hassas bileşenlerin varlığında koruduğu belirtilmiştir. Bunun yanı sıra, pek çok uygulamada bu teknolojilerin azalan ekstraksiyon süresinde maksimum verimliliği sağladığı için enerji yönünden alternatif olarak ekonomik olduğu

kaydedilmiştir [35]. Belirtilen bu sebeplerden dolayı gelişmiş ekstraksiyon yöntemleri “Yeşil Ekstraksiyon” teknikleri olarak da sınıflandırılmaktadır [35].

Mikrodalga destekli ekstraksiyon için iki ekipman türü kullanılabilir; en sık kullanılanı ekstraksiyonda kontrollü basınç ve sıcaklık altındaki kapalı bir kap sistemi olarak tanımlanmıştır. Diğer ekipman türü ise çözücünün kaynama noktası dikkate alınarak ulaşılabilecek maksimum sıcaklık ve atmosferik basınç altında açık ekstraksiyon kabı sistemi olarak tanımlanmıştır. Mikrodalga altında ekstraksiyon etkinliği hem çözücü hem de örneğin doğasına bağlıdır. Ekstrakte edilecek farklı bileşenlerin çözünürlüğünün, çözücünün karışım oranı sabitlenerek ve sıcaklık/güç oranı kontrol edilerek maksimuma çıkarılabildiği belirtilmiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon laboratuvarlarda sentetik, analitik ve üretim uygulamalarında kullanılmaktadır [35].

Süperkritik sıvı ekstraksiyonunda kullanılan çözücü, kritik sıcaklık ve basınç değerlerinin üzerine getirilerek süperkritik akışkan özelliği kazanmaktadır. Böylece sıvılar gibi yüksek yoğunluk ve çözme gücüne, gazlar gibi ise düşük viskozite ve sıfır yüzey gerilimine sahip gaz-sıvı arası bir özellik gösterdiği kaydedilmiştir. Bu ekstraksiyon yönteminin avantajları arasında; düşük sıcaklıkta, kısa sürede ve yüksek verimlilikte gerçekleşmesi, kolaylığı ve çevre kirliliği oluşturmaması sayılmaktadır. Ayrıca oksidasyona maruz kalmayan, seçiciliği yüksek ve çözücüsü tamamen uzaklaştırılmış bir ekstre elde edilmektedir. Karbondioksit (CO₂) en yaygın kullanılan süperkritik sıvıdır ve etanol, metanol, hekzan gibi yardımcı çözücülerle beraber kullanıldığında çözücü etkinliği artar [29].

Basıncılı sıvı ekstraksiyonu bitkilerdeki biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu ile ilgili olarak geliştirilmiştir. Suyu çözücü olarak kullanan bu metod, biyoaktif bileşenlerin tespiti için oldukça uygundur ve diğer tekniklere kıyaslandığında daha hızlı olduğu kaydedilmiştir [31].

Ultrason destekli ekstraksiyon işleminde yaygın olarak kullanılan ultrason uygulaması ile oluşan mikron ebatındaki oyukçuklar, hücre duvarında bozunmaya ve parçacık boyutlarında küçülmeye neden olmaktadır ve böylece kütle transferini hızlandırarak ekstraksiyon etkinliğini arttırmaktadır. Ultrason destekli ekstraksiyon, işlem süresini kısaltmakla birlikte daha yüksek saflıkta ürün eldesi sağlamaktadır. Bu

yöntemle enerji sarfiyatının azaldığı ve daha az çözücü kullanımı ile çevreci bir teknoloji olduğu kaydedilmiştir [29].

Enzim destekli ekstraksiyonda, enzimatik ön işlem, bağlı bileşiklerin serbest hale gelmesi ile genel anlamda verimin artırılması için etkili bir yol olarak görülmektedir. Ekstraksiyon için diğer geleneksel ekstraksiyon prosedürlerinde kullanılan miktarda yüksek çözücü kullanımı gerekmediği için, çevreye zararının az olduğu ve proses için gerekli enerji girişinin düşük olduğu kaydedilmiştir. Ekstraksiyon metodu enzimlerin hücre duvarı veya zarından geçirgenliğini artırma temeline dayanmaktadır [31].

Bitkisel matrislerden elde edilen çeşitli biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda tüm bu gelişmiş tekniklerinin etkinliği kanıtlanmıştır. Yeşil ekstraksiyon tekniklerinin, endüstrinin taleplerine uygun, uzun süre gerektirmeden ve daha az enerji harcanarak ekstraksiyon yönteminin tamamlanabildiği, safsızlıkları ve toksik bileşikleri ortadan kaldıran, bozunmayı ve ekstraksiyon sırasında fonksiyonelliğin kaybını önleyen teknikler olduğu raporlanmıştır [35].

3.8. Propolis Eldesi ve Yapılan Çalışmalar

Ristivojević vd. (2018) yaptıkları çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen propolis örneklerinden hangisinin farmakolojik ve/veya gıda sektörü için daha iyi bir hammadde kaynağı olabileceğine dair sorunun cevabını aramayı amaçlamışlardır. Ultra yüksek performans sıvı kromatografi ile Türk kavak türü propolisin O ve B alt türlerinin detaylı fenolik yapısının çıkarılmasının amaçlandığı çalışmada, toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içerik hakkında yapılan analizler sonucunda veriler kaydedilmiştir. Çalışmanın sonucunda, Türk propolis örneklerinin sahip olduğu antimikrobiyel etkisi incelenmiştir ve antimikrobiyel etkiye propoliste bulunan fenolik asitlerin katkısının flavonoidlerin katkısından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [36].

Ayrıca propolis hakkında yapılan araştırmalarla ispatlanmış olan sağlığa olumlu etkileri sayesinde, ticari propolise olan talebin sürekli artmakta olduğu belirtilmiştir. Bunun yanında bazı propolis ürünlerinin kimyasal bileşimleri kontrol edilmeden, bitkisel kaynakları tanımlanmadan ve propolis türü belirlenmeden satışa sunulduğu belirtilmiştir. Bal arılarının yeterli bitki kaynağını çevrelerinde bulamadığında,

çevredeki boya, asfalt ve mineral yağlarını toplayabildikleri belirtilerek, toksik kontaminasyon ve azalan farmakolojik etkileri sebebiyle kontrolsüz üretilen propolis içeren bu tür ürünlerin tüketilmesi durumunda insan sağlığı açısından riskli olacağı konusunda uyarılar yapılmıştır. Bu sebeple propolisin olumlu ve olumsuz riskli durumlarda sağlığa doğrudan etkisinin olduğu bilindiği için propolisin botanik kaynağını, kimyasal bileşimini belirlemenin, kalitesini analiz etmenin son derece önemli olduğu hususunda uyarılar yapılmıştır [36].

Guzelmeric vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada, Türk propolisinin çeşitli alt sınıflarının antioksidan ve antiinflamatuvar aktiviteleri kıyaslanarak farmakolojik ürün geliştirmede hangi propolis türünün daha etkili olduğu araştırılmıştır. Araştırmanın sonucunda propolis türüne bağlı olarak, kimyasal bileşiminin farklı olduğu ve bunun da farmakolojik etkisinde farklılıklara sebep olacağı belirtilmiştir. Bu yüzden propolisin farmakolojik etkinliğinde botanik kaynağının belirlenmesinin oldukça önemli olduğu kaydedilmiştir. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda karakavak türü propolis örneğinin Euroasian-aspen türü propolisle kıyaslandığında daha yüksek antiinflamatuvar ve antioksidan özellikler gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır [37]. Propolisin botanik kaynağının tespit edilmesi, propolisi tanımlamada ve propolis standartlaştırma çalışmalarında çok önemlidir.

Irigoitı vd. (2021) tarafından ekonomik açıdan bakıldığında propolis ve propolis türevi ürünlerin yerel, bölgesel ve küresel pazara girme potansiyelinin bulunduğu belirtilmiştir. Propolisle ilgili artan talebin arıcılar ve endüstri için iş imkânlarını arttırdığı kaydedilmiştir. Bunu akılda tutarak geleneksel yollarla el yapımı üretimden endüstriyel üretime geçilmesi gerekliliği vurgulanmıştır. Her şeyin, özellikle gıda endüstrisindeki propolis pazarının başlangıç aşamasında olduğu ve birkaç yıl içinde, bu ürünün farklı türde gıdalarda, farklı ve daha fazla uygulamalarının görülebileceği belirtilmiştir [27].

Ancak Özkök vd. (2021) tarafından propolisin pazarlanmasında, gıdalarda hammadde olarak kullanımında zorluklar bulunduğu, ulusal veya uluslararası propolis standardı bulunmadığı kaydedilmiştir [28].

3.9. Propolisin Alerjen Potansiyeli

Birçok rapora göre propolis toksik değildir ve güvenilirdir. Burdock vd'nin araştırmasına göre insanlar için güvenilir doz; yaklaşık olarak 70 mg/gün ya da 1,4 mg/kg vücut ağırlığı/gün olarak hesaplanmıştır. Propolisin tek olası olumsuz etkisi alerjik reaksiyondur; bununla birlikte sadece oral yolla verildiğinde nadiren duyarlı hale getirme etkisinin olduğu anlaşılmaktadır. Propolisin sebep olduğu alerjik reaksiyonların, lokal olarak uygulanması sonucunda sıklıkla görüldüğü kaydedilmiştir. Raporlara göre propolise karşı alerjen olan kişi oranı %1,2 ile %6,6 arasında değişmektedir [38].

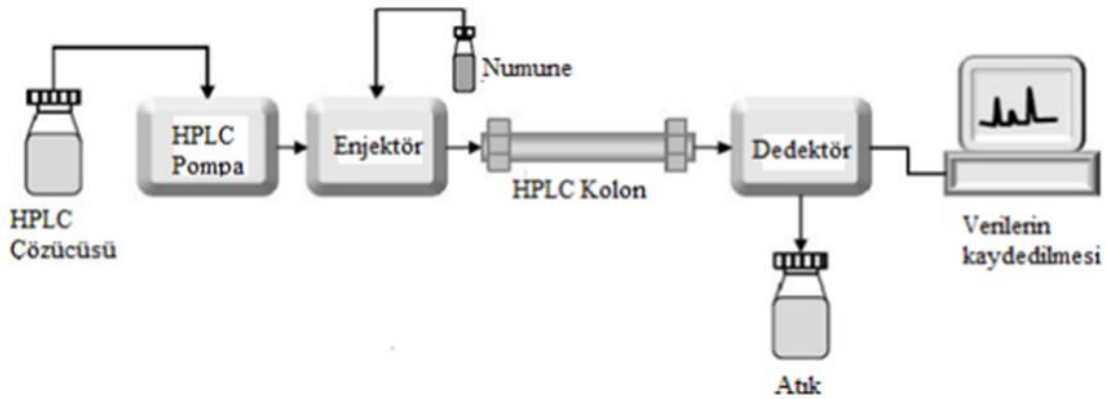
4. PROPOLİSİN STANDARDİZASYONU AMACIYLA TOPLAM FENOLİK İÇERİĞİNİN ANALİZ YÖNTEMLERİ

Özdal vd. tarafından tüm dünyada propolisin fenolik içeriğini belirlemek amacıyla çeşitli analitik metodların kullanıldığı, ancak en hassas ve çoğunlukla başvurulan metodun kütle spektrometresi ile sıvı kromatografisinin bileşimi (LC-MS) olduğu belirtilmiştir. Bu konuda yapılan literatür incelemesinde LC-MS yöntemi ile daha az miktarda bile olsa yeni bileşenlerin bulunduğu ve alışlagelmiş metodları kullanarak gözlemlenmenin zor olduğu daha yapısal bilgilerin alındığı kaydedilmiştir [21].

Kromatografik metodlar ve özellikle HPLC, propolisin fenolik profilini oluşturan bileşiklerin ayrılması ve miktarlarının belirlenmesi için kullanılmıştır. Escriche vd. tarafından propoliste fenolik profilin analizini standardize etmek için yapılan çalışmada, farklı ülkelerden elde edilen her bir ham propolis örneğinin (10-15 g) analiz öncesinde -18°C'de muhafaza edildiği kaydedilmiştir. Ekstraksiyon öncesinde dondurulmuş olan örnekler, homojenize etmek amacıyla öğütülmüştür. Farklı ekstraksiyon yöntemleri sırasıyla maserasyon-maserasyon, ultrasonikasyon-ultrasonikasyon, maserasyon- ultrasonikasyon olarak bu çalışmada kullanılmıştır. Maserasyon yöntemi kullanılarak yapılan ekstraksiyonda; tartılan örnekler 30 ml % 70'lik etanol çözeltisinde çözündürülmüş ve karanlık bir ortamda 24 saat sabit hızla karıştırılmıştır. Daha sonra 5 dakika süre ile 5°C'de 5000 devir/dak. da santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen çözeltideki süpernatant filtrasyonla (Whatman 3) ayrılmıştır. Bu işlem tekrar edilmiş ve elde edilen iki süpernatant volümetrik bir balonda toplanmış ve % 70'lik etanol çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanarak ekstraksiyon işlemi tamamlanmıştır.

Fenolik profilin kromatografik yöntemle belirlenmesi amacıyla, her bir standardın stok çözeltileri 10 mg/ml olacak şekilde metanolla hazırlanmıştır ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışılan standart karışım çözeltileri 5 kalibrasyon seviyesi elde etmek için her bir stok standart çözeltiden uygun miktarlarda seyreltilerek hazırlanmıştır ve sonuç olarak elde edilen konsantrasyonlar 5, 10, 20, 200, 1000 µg/ml'dir.

Entegre degazer ile ikili pompaya sahip Aligent 1120 Compact LC HPLC cihazı, bir otomatik örnek enjektörü, kolon fırını ve fenolik profili belirlemek için UV/VIS dedektör kullanılmıştır. Kromatografik ayırım C18 kolonda (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, Tecnokroma) gerçekleştirilmiştir. Yürütüm süresi 30 dakika ve sonrasında 1 dakika olarak uygulanmıştır.



Görsel 4.1. Şematize HPLC cihazı

Yöntemin detayları; Kolon fırını (30 °C); hareketli faz A (%5 formik asit); hareketli faz B (asetonitril); akış hızı (0,8 ml/dak.) enjeksiyon iğnesi %100 asetonitrille yıkanmış ve enjeksiyon hacmi (1 µl); 295 nm'de tespit yapılmıştır.

Tüm analiz süreçlerinde kromatografik girişimleri kontrol etmek amacıyla kör enjeksiyon yapılmıştır. Tüm standartların geçiş zamanları tek tek standart enjeksiyonları ile doğrulanmıştır. Her çalışma gününde, geçiş zamanlarının kontrolü amacıyla standart bir karışım enjekte edilerek doğrulama yapılmıştır. Kromatografik analiz öncesinde örnekler 0,2 µm gözenek boyutlu membran filtresi ile filtre edilmiştir. Romanya'dan 3

örnek, İspanya ve Honduras'tan bir örnekle yapılan çalışmada İspanya'dan getirilen örneğin toplam fenolik bileşiğinin en yüksek olduğu tespit edilmiştir [47].

Benzer şekilde Arslan vd. tarafından Türkiye'de farklı iklime sahip Erzurum ve Ardahan bölgelerindeki (*Apis mellifera caucasica*) arılarından elde edilen propolisin inorganik ve organik bileşimlerini, biyolojik aktivitelerini karşılaştırmak için yapılan çalışmada tüm propolis örnekleri Ekim 2016'da toplanmış ve -80°C'de muhafaza edilerek analiz için kullanılmıştır. Etanolle ekstraksiyon metodu ile 2g katı propolis 100 ml %70'lik etanol ile karıştırılmıştır. Karışım ultrasonik banyoda 30 dak. karıştırılmış ve çözücü döner evaporatör ile uzaklaştırılmıştır (60°C ve 16-17 kPa). Kurutulmuş madde daha sonraki kullanımlar için %70'lik etanolde çözündürülerek 20mg/ml çözelti daha sonraki analizler için hazırlanmıştır. Propolis ekstratlarında fenolik asit bileşimi analizi için ODS-3 kolon (250 mmx 4,6mm, 5µm, Inertsil, GL Sciences Inc.) ile HPLC (Prominence LC-20A, Shimadzu Corp.) kullanılmıştır. 25°C sıcaklıkta, enjeksiyon hacmi 20µl, kolon basıncı 200 bar ve akış hızı ortalama 0,7 ml/dak olarak çalışılmıştır. Eluent A asetik asit, su ve metanol karışımı (v/v/v 1/89/10) ve eluent B asetik asit, metanol karışımı (v/v 1/99) sırasıyla 3, 18, 30, 35, 40, 55, 65, 68.dakikalarda çözelti oranları %95, 80, 75, 70, 60, 50, 40 ve 0 olacak şekilde %100 çözüldürülen başlanarak ve değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Diyot array dedektörü kullanılarak farklı fenolik asitler için 226 nm dalga boyu ile 254 nm dalga boyları arasında ölçümler yapılmıştır. Sonuç olarak her iki ilden elde edilen propolis örneklerinin toplam flavonoid ve fenolik içerikleri karşılaştırıldığında Ardahan ilinden getirilen propolis örneklerinin Erzurum ilinden getirilenlere göre daha fazla fenolik (2,18 kat) ve toplan flavonoid içeriğine (1,79 kat) sahip olduğu tespit edilmiştir [48].

Özkök vd. tarafından Türkiye'de elde edilen propolisin standardizasyonu amacıyla, antioksidan aktivitesinin ve fenolik bileşenlerinin belirlenmesi için yapılan çalışmada, HPLC bileşen analizi için toz haline getirilmiş 1 g ham propolis tartılarak 50ml. Lk falcon tüpe aktarılmıştır. Üzerine 30 ml, %70'lik etanol çözeltisi ilave edilerek bir karıştırıcı ile 24 saat karıştırılmıştır. Santrifüjleme sonrası üstteki faz 100 ml volumetrik balona aktarılmıştır. Karıştırma işlemi tekrarlanıp üst faz ilk ekstrenin aktarıldığı volumetrik balonda toplanmıştır ve %70'lik etanol çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Çözelti bir PVDF şırınga filtre ile filtre edilmiş, küçük şişeye doldurularak 20 µl si HPLC cihazına enjekte edilmiştir. VWR Hitachi HPLC- UV

dedektör (UV 280 nm) ve supercosil LC-18 25 cm x 4,6 mm, 5 µm kolon kullanılmıştır. Hareketli faz A; %99 ultra saf su ve %1 asetik asitten oluşmaktadır. Hareketli faz B; %100 metanolden oluşmaktadır ve kolon içi akış hızı 0,9 ml/dak uygulanmıştır. Sonuç olarak, ham propolis içeriğinin elde edildiği bölgenin botanik yapısına bağlı olarak değiştiği kaydedilmiştir. 3 fitocoğrafik bölge Türkiye’de yer aldığı için (Avrupa ve Sibirya, Akdeniz, İran ve Turan) ve bölgeden bölgeye bitki çeşitliliği arttığı için, Türkiye zengin bir botanik kaynağa sahiptir. 3000’i endemik olmak üzere Türkiye’de 12.000 bitki türünün bulunduğu kaydedilmiştir. Bunların yaklaşık 500’ü bal arıları tarafından tercih edilen nektar bitkileridir. Bu çalışmada Türkiye’nin farklı bölgelerindeki 23 şehirden elde edilen propolis örneklerinin içeriğinin çok değişken bulunduğu ve propolis standardizasyonu için içerik analizi yapmanın gerekliliği ortaya konulmuştur. Toplam fenolik madde ve flavonoid madde miktarları ve içermesi gereken bileşen maddeler genel olarak tanımlandığı takdirde, bu bileşenlerin ticari olarak Türk propolisinin kalite kontrolü amaçlı kullanılabilmesi özellikle vurgulanmıştır [28].

Sarıkahya vd. tarafından yapılan çalışmada, Türkiye’nin farklı coğrafi bölgelerinden elde edilen 39 propolis örneğinin biyolojik aktivitesinin ve kimyasal içeriğinin analizi amaçlanmıştır. Örneklerin flavonoid, fenolik ve triterpen içerikleri LC-MS kullanılarak ölçülmüştür ve aynı zamanda antiviral özellikleri hakkında araştırma yapılarak sitotoksiteleri incelenmiştir. Yapılan LC-MS ölçümlerinde izosakuraneti, naringenin, ramnositrin, diosmetin, krisin, 3-O-metil-kersetinin Türk propolisinde en sık rastlanan flavonoidler olduğu ve en temel fenolik asidin de kafeik asit olduğu tespit edilmiştir. Oleanolik asit ve hederagenin de en temel triterpen bileşikler olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada benzer çalışmalardan örnek verilerek; Avrupa ve Çin’den elde edilen propolis örneklerinin flavonoid ve fenolik içerikleri hakkında pek çok araştırma yapıldığı, tropik bölgelerden elde edilen propolislerde de sadece fenolik bileşenlere değil aynı zamanda terpenoidlere ve kumarik asitin prenilate türlerine de rastlandığı belirtilmiştir. Bu araştırma sonucunda Türkiye’den elde edilen propolis de Çin ve Brezilya propolisi ile benzer içeriğe sahip olduğu vurgulanmıştır. Oleanolik asit, tormentik asit ve hederagenin gibi triterpenleri yüksek miktarda içeren Türkiye propolisinin yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği de bu çalışmada kaydedilmiştir. Son yıllarda yapılan literatür incelemelerinde, propolisin antiviral etkisi hakkında da pek çok çalışmaya rastlanmaktadır. Geniş kullanım alanlı

antiviral ilacı olan favipiravirin *in vitro* ve *in vivo* analizlerde farklı RNAların replikasyonlarını engellediği tespit edilmiştir.

Sarıkahya vd. nin bu çalışması göstermiştir ki propolis örnekleri favipiravirden daha fazla viral aktivite göstermiştir. Bu araştırmanın sonuçlarına göre favipiravirin enfekte bronşit virüsüne karşı hiç antiviral aktivitesinin olmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda Türkiye’den elde edilen propolisin avian koronavirüsüne karşı etkisi ilk defa incelenmiştir [11].

5. TAKVİYE EDİCİ GIDALARDA PROPOLİS KULLANIMININ YASAL DÜZENLEMELERİ

Gıda üretiminde çeşitli bileşenlerin son ürüne uygulanması, üretimin mevcut yasal düzenlemelere uygun olması ile mümkündür. Yasal düzenlemeler propolisi sağlıklı gıda üretimi kategorisi altında sınıflandırmaktadır. Bununla birlikte, ülkeye bağlı olarak farklı şekilde sınıflandırılabilir ve belirli düzenleme gerekliliklerine tabi tutulabilir. Mevcut durumda, propolisin kullanımıyla ilgili yasal düzenlemeler Brezilya, Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa Birliği, Avustralya, Kanada, Çin, Japonya ve Kore’de tanımlanmıştır.

Avrupa Birliği (EU) Direktif 2002/46/EC’de propolis takviye edici gıda olarak sınıflandırılmıştır. Avrupa Birliği, Avrupa Parlamentosu ve Konseyinin 2002’deki yasal düzenlemesinde bu gıda grubu, “besleyici ve fizyolojik etkili gıdalar ve diğer maddelerin konsantre kaynakları” olarak tanımlanmaktadır. Ne yazık ki, Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (EFSA) tarafından üretim yeri ve ekstraksiyon metoduna bağlı olarak farklı propolis formülasyonlarının bileşiminde farklılıklar olduğu kabul edilerek ve aynı zamanda propolisin bütün özelliklerinin tam tanımlanmamış olmasına bağlı olarak, gıda ürün etiketlerine propolisin ilavesini sağlayacak şekilde sağlık beyanı yayınlanması uygun bulunmamıştır [38].

Brezilya dünya piyasalarına propolis tedarik eden en önemli ülkedir. Brezilya’nın güneydoğusundan uzun yıllardır ihraç edilen yeşil propolis, Brezilya propolisi olarak tanınmıştır. Brezilya’da 2001 yılında yürürlüğe giren propolisin kalitesini tanımlayan teknik mevzuata göre; maksimum balmumu içeriği % 25 (*a/a*), maksimum nem içeriği % 8 (*a/a*) ve minimum flavonoid içeriği % 0,5 (*a/a*) olmalıdır [39]. Sawaya vd. Brezilya mevzuatına göre propolisin maksimum kül içeriğinin %5

(a/a) ve etanolle ekstrakte edilebilen bileşenlerin minimum %35 (a/a) olması gerekliliğini kaydetmişlerdir. Ayrıca Brezilya mevzuatında ham propoliste minimum flavonoid içeriğinin %0,5 (a/a) ve minimum fenolik içeriğinin %5 (a/a) olarak tanımlandığı kaydedilmiştir [40].

Avrupa Birliği'nin 2002/46/EC Direktifi'nde (gıda takviyeleri konusunda üye ülkelerin mevzuatı) takviye edici gıda; normal beslenmeyi takviye etmek amacıyla, vitamin, mineral, protein, karbonhidrat, lif, yağ asidi, amino asit gibi besin öğelerinin veya bunların dışında besleyici veya fizyolojik etkileri bulunan bitki, bitkisel ve hayvansal kaynaklı maddeler, biyoaktif maddeler ve benzeri maddelerin konsantre veya ekstraktlarının tek başına veya karışımlarının kapsül, tablet, pastil, tek kullanımlık toz paket, sıvı ampul, damlalıklı şişe ve diğer benzeri sıvı veya toz formlarda hazırlanarak günlük alım dozu belirlenmiş ürünleri ifade eder [41].

Avrupa Birliği'nin 2002/46/EC Direktifi, takviye edici gıdalar, vitaminler ve mineraller gibi gıda takviyesi bileşenleri hakkında hükümleri de içermektedir. Takviye edici gıdaların üretiminde vitamin ve mineral kaynakları olarak kullanılan kimyasal maddelerin güvenilir ve insan tüketimine uygun olması gerekliliği öngörülmektedir. Takviye edici gıdaların etiketlenmesine ilişkin düzenlemeler ayrıca tanımlanmıştır. Genel etiketleme kuralları (Düzenleme No 1169/2011) dışında takviye edici gıdalar için (2002/46/EC) bazı özel uygulamalar tanımlanmıştır. Buna göre, etiketleme, sunum, reklam ve benzerleri; takviye edici gıdanın tüketiminin, insan hastalığına neden olan risk faktörünü önemli ölçüde azalttığını belirten, ileri süren veya ima eden herhangi bir sağlık beyanını içermemelidir. Takviye edici gıdalar sağlığa yardımcı olarak nitelendirilmiştir.

Sağlık beyanı; herhangi bir gıda grubunun, gıdanın veya gıdanın bileşiminde bulunan öğelerin sağlıkla ilişkisini belirten, ileri süren veya ima eden beyanı ifade eder.

Bu tür gıda takviyelerinin etiketi uygun sağlık beyanlarını içerebilmektedir. Avrupa Birliği tarafından yayımlanan 1924/2006 sayılı düzenlemede gıdalarda kullanılacak sağlık ve beslenme beyanlarını içeren mevzuat yayımlanmıştır [42]. Takviye edici gıdaların onaylanması aşamasında; Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (EFSA), Müracaat Sahibi tarafından sağlanan beyandaki bilimsel verileri değerlendirmektedir. Daha sonra, başvuru onay ve ruhsatlandırma için Avrupa

Komisyonu'na sunulmaktadır. EU Düzenlemesi No 432/2012'nin % 60'ından fazlası vitaminler ve mineraller ile ilgili onaylanmış beyanlara dayanmaktadır. Bazı diğer gıdalar ve besinler de bu Düzenlemenin pozitif listesinde yer almaktadır. Bununla beraber, eğer bu listede olmayan özel bir besin aranıyorsa, bu durumda bu besinin statüsü AB mevzuatında kontrol edilmelidir. Statüsü Ruhsatlı veya Ruhsatsız olabilmektedir ve botanikler için EFSA Mevzuatında "beklemede" olabilmektedir [42].

Vitaminler, mineraller, aminoasitler, esansiyel yağ asitleri, lifler, çeşitli bitkiler ve bitki ekstreleri arasında yer almayan ve takviye edici gıda içinde değerlendirilebilecek gıda ve diğer bileşenler bulunmaktadır. Propolis ve arı sütü bunlardan bazılarıdır. AB Düzenlemesi No 432/2012'de belirtilen ve kabul edilmiş sağlık beyanlarının propolis için uygun olmadığı değerlendirilmiştir. Beslenme ve sağlık beyanlarıyla ilgili, AB Mevzuatı'nda, propolis için hiçbir onay verilmemiş ve dolayısıyla olası sekiz sağlık beyanı propolis için uygun görülmemiştir. Her biri için Mevzuata uyulmadığı duyurulmuştur çünkü bilimsel kanıt temelinde değerlendirildiğinde, propolisin sağlık durumuna bir etkisini iddia etmek amacıyla yeterince standartlaştırılmadığı için, net bir tanımlama yapılamadığı kabul edilmiştir ve sonuç olarak beyan doğrulanamamıştır. Sadece  r n etiketinde besin beyanı "propolis içermektedir" şeklinde yer alabilir. Ancak ürünün içerdiği propolis miktarının belirtilmesi zorunludur [42].

Birleşmiş Devletlerde gıda takviyelerinin üretilmesi ve satışı hakkında yasal düzenlemeler incelenmiş, iyi üretim uygulamaları ihlallerinin tanımılandığı tespit edilmiştir. Üretim kayıtlarının bulunması, yazılı kalite kontrol kriterleri veya prosedürlerinin bulunması, son ürün özellikleri ve satışa sunma kriterlerinin tanımlanması, gıda takviyesinin bileşenlerinin tanımlanması, son ürünün belirtilen kriterlere uygunluğunun ve bileşen ve son ürünün uygunluğunun bilimsel geçerliliği olan yöntemlerle kanıtlanması, üretim yeri gereklilikleri olarak tanımlanmıştır.

5.1. Türkiye'de Takviye Edici Gıdalara İlişkin Mevzuat

Türkiye'de gıda ve yem güvenilirliğini, halk sağlığı, bitki ve hayvan sağlığı ile hayvan ıslahı ve refahını, tüketicisi menfaatleri ile çevrenin korunması da dikkate alınarak korumak ve sağlamak amacıyla Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu ve ilgili uygulama yönetmelikleri yayımlanmıştır. Takviye edici gıdalarla

ilgili, Takviye Edici Gıdaların İthalatı, Üretimi, İşlenmesi ve Piyasaya Arzına İlişkin Yönetmelik, Türk Gıda Kodeksi Takviye Edici Gıdalar Tebliği ve uygulama talimatları Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından hazırlanarak yürürlüğe koyulmuştur. Tebliğ ve ilgili mevzuat, ilgili tebliğin Dayanak bölümünde belirtildiği gibi Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği ve 2002/46/EC sayılı Gıda Takviyeleri ile ilgili Üye Ülke Mevzuatının Birbirine Yaklaştırılması ile ilgili Avrupa Parlamentosu ve Konsey Direktifine paralel olarak hazırlanmıştır [42]. Ülkemizde gıda güvenilirliğini kontrol etmek amacıyla risk esaslı resmi kontroller Tarım ve Orman Bakanlığı resmi kontrol görevlileri tarafından yürütülmektedir.

Coppens ve Pettman tarafından Avrupa Birliği'nde takviye edici gıdalarla ilgili mevzuatın ele alındığı araştırmada belirtildiği gibi; Genel Gıda Kanunu (178/2002), gıda takviyeleri alanındaki direktif (2002/46), takviye edilmiş gıda mevzuatı (Mevzuat 1925/2006), besin ve sağlık beyanları mevzuatı (Mevzuat 1924/2006) temel prensipleri kapsamında kontroller yapılmaktadır. Coppens ve Pettman'ın incelemesine göre gıda takviyelerinde vitamin ve mineraller dışında diğer maddeler için özel kurallar henüz tanımlanmamıştır, çünkü propolis gibi maddelerin yapısal karmaşıklığı ve bilimsel ve metodolojik zorluklar sebebiyle kriter belirleme ve tanımlama yapmada zorluk çekilmektedir [49].

Vujic ve Pollak tarafından Avrupa Birliği'nin arıcılık ürünleri içeren gıda takviyelerinin bileşimi, etiketlenmesi ve güvenilirliği hakkında mevzuatının incelendiği araştırmalarında; Avrupa Komisyonunun gıda takviyelerinin etiketlenmesi hakkında 1169/2011 nolu mevzuatının ve 2002/46/EC direktifinin bulunduğu belirtilmiştir. Etiketlemede, sunumda ve ürün reklamında takviye edici gıdanın hastalıkları tedavi edici, önleyici, azaltıcı etkisinin olduğuna dair atıf veya tanımlama yapılamayacağı mevzuatta belirtilmiştir. Vujic ve Pollak, propolis Mevzuat No432/2012'de koşul olarak kabul edilen sağlık beyanlarını karşılamayan bileşiklerin kompleks bir karışımı olduğunu ifade etmiştir [42].

Yaptıkları mevzuat incelemesinin sonucunda Vujic ve Pollak, henüz EFSA ve Avrupa Birliği'nin yayımladığı Besin ve Sağlık Beyanları mevzuatına göre propolis içeren gıda takviyeleri için onaylanan bir sağlık beyanının olmadığı belirtilerek, bu ürünlerin analizinin doğal olarak bu ürünlerin yapısında bulunan biyolojik aktif maddelerden galangin ve 10-HDA'nın bulunmasına dayandığı belirtilmiştir [42].

Türkiye’de gıda güvenirliliği kapsamında yürütülen resmi kontroller risk esasına göre planlanmaktadır. Takviye edici gıdaların üretim öncesinde ürün bazında onay numarası alması zorunlu hale getirilmiştir. Bu sayede tıpkı AB mevzuatında olduğu gibi, ürünlerin piyasaya sunulması öncesinde Takviye Edici Gıda Komisyonu tarafından incelenmesi sağlanmıştır. Talimatın Takviye Edici gıdaların onayı ile ilgili hususlar bölümünde propolis içeren takviye edici gıdalarda mevzuat kapsamında yer alan çözücülerin kullanılabilmesi, çözücünün ürün etiketinde belirtilmesinin zorunlu olduğu belirtilmiştir. Ürün etiketinde saf propolis miktarının ağırlık ve yüzde cinsinden beyanı zorunlu tutulmuştur. Takviye edici gıdalarla ilgili onay başvurularında üretim öncesinde üretim yapılması planlanan işletmenin resmi kontrol görevlileri tarafından kontrolü ve HACCP gerekliliklerine uygunluğu aranmaktadır.

Ayrıca propolis, Takviye Edici Gıdalar Kısıtlı Maddeler Listesi’ne, 08/03/2016 tarihinde girmiştir. Bakanlık tarafından 4-10 yaş günlük alım dozu ve yetişkin günlük alım dozu minimum ve maksimum limitleri henüz belirlenmemiştir. Listede yer alan propolis ifadesi ile “ bal mumundan ayrılmış olan saf propolis” kastedildiği belirtilmiştir ve propolisin yapısının çok farklı maddeler içermesi, yüksek ısıda protein ve enzimlerin bozulmaları ve toksik bileşikler oluşabilmesi nedeniyle propolis ekstraksiyonunda kullanılacak maksimum sıcaklık derecesinin 70°C’yi aşmaması gerektiğine ilişkin karar alınmıştır. Tüm bu mevzuat gereklilikleri göstermektedir ki, Türkiye’de gıda güvenirliliğinden sorumlu resmi otorite, takviye edici gıda üretimi ve piyasaya arzına ilişkin mevzuatını dünyada uygulanan mevzuata paralel ve güncel tutmakta ve Takviye Edici Gıda Komisyonu ile bilimsel temelleri dikkate almaktadır.

6. SONUÇ

Propolis bitkisel kaynaklı bir arıcılık ürünüdür. Ham propolisin kimyasal bileşimi ve biyolojik aktiviteleri propolisin elde edildiği kovanın yapısı, kovanın bulunduğu coğrafi bölge ve bölgenin botanik çeşitliliği, iklim, arı türü, toplandığı mevsim gibi çevresel faktörlere, arıcının tecrübesi, propolisin temin edildiği kovadaki arıların sağlığı, propolisin kovandan elde edilme yöntemi, hatta kullanılan ekstraksiyon sıvısı ve metoduna göre değişkenlik göstermektedir. Ham propolisten saf propolis elde etme yöntemleri analitik açıdan incelenmiştir. Analitik çalışmalarda en çok sıklıkla kullanılan ekstrelerin etanol ekstreleri olduğu, farklı konsantrasyonlarda ise metanol ve suyun çözücü olarak kullanıldığı kaydedilmiştir. Propolisin %10-25 alkolle yapılan ekstrelerinden kurutulmuş filtratların tamamıyla suda çözünür olduğu tanımlanmıştır. Gıda takviyesi bileşeni olarak kullanılan saf propolislerin bu özelliği aşması, üretim kalitesi açısından önemli olarak kabul edilmektedir. Propolisin bölgesel üretimin standartlaştırılması amacıyla, bileşenleri hakkında içeriğinde flavonoidlerin ve fenolik asitlerin çeşitliliği ve miktarları HPLC LC-MS başta olmak üzere çeşitli analiz yöntemleri ile belirlenmektedir ve bu amaçla yapılan çalışmalar incelenmiştir.

Yapılan literatür taramasında, son yirmi yıldır propolisin biyolojik özelliklerini farklı açılardan inceleyen çok sayıda araştırma yayımlandığı görülmüştür. Bununla birlikte, ne kadar “güçlü”, “kayda değer” veya “belirgin” etkinlikler kaydedilmiş olsa da bu araştırmaların önemli bir bölümü sınırlı oranda faydalı bulunmuştur. Sebebi, karşılaştırma ve sonuçların bilimsel değerlendirmesi için temelden yoksun olmalarıdır. Çünkü çalışmalarda propolis örneklerinin kimyasal doğasından, nereden elde edildiğinden hiç bahsedilmemiştir. Bu çalışmalar sadece propolis ekstreleri ile analiz gerçekleştirildiğini kaydetmektedir. Ancak şunu belirtmek gerekir ki doğada hazır halde saf “propolis” diye bir şey bulunmamaktadır. Belirli bir coğrafi bölgeden temin edilen ham propolisin standartlaştırma amaçlı analitik araştırılmasının yapılmasının bilimsel bir sonuca ulaşmada etkili olabilmesi için, ham propolisin temin edildiği coğrafi bölgenin botanik özellikleri de araştırılıp, propolisin standardizasyonu araştırmalarında temel kriter olarak araştırmaya yansıtılması bilimselliği destekleyici bir adım olacaktır.

Ayrıca propolis hakkında yapılan araştırmalarla ispatlanmış olan sağlığa olumlu etkileri sayesinde, ticari propolise olan talebin sürekli artmakta olduğu belirtilmiştir. Bunun yanında bazı propolis ürünlerinin kimyasal bileşimleri kontrol edilmeden,

bitkisel kaynakları tanımlanmadan ve propolis türü belirlenmeden satışa sunulduğu belirtilmiştir.

Bu sebeple propolisin olumlu ve olumsuz riskli durumlarda sağlığa doğrudan etkisinin olduğu bilindiği için, propolisin botanik kaynağını, kimyasal bileşimini belirlemenin, kalitesini analiz etmenin son derece önemli olduğu hususunda araştırma sonuçları kaydedilmiştir.

Ekonomik açıdan bakıldığında propolis ve propolis türevi ürünlerin yerel, bölgesel ve küresel pazara girme potansiyelinin bulunduğu belirtilmiştir. Propolisle ilgili artan talebin arıcılar ve endüstri için iş imkânlarını arttırdığı kaydedilmiştir. Bunu akılda tutarak, geleneksel yollarla el yapımı üretimden endüstriyel üretime geçilmesi gerekliliği vurgulanmıştır.

Ancak bilindiği gibi tüm dünyada bitkisel kaynaklı gıdaların güvenilirliğini mümkün hale getirmek için iyi tarım uygulamaları kapsamında bitkisel üretim basamaklarının (gübreleme, sulama, ilaçlama, mahsul toplama vb.) tanımlanması ve kayıtlarının tutulması gerekmektedir. Ayrıca uluslararası çalışmalar ve uygulamalar tüm ülkelerde aynı şekilde uygulanmaktadır. Benzer şekilde arıcılık ürünleri ve bu ürünlerden biri olan propolis ile ilgili üretim basamakları tanımlanmalıdır. Propolisin nasıl, ne zaman, hangi coğrafi bölgeden elde edildiği, propolis tuzaklarının türü, tuzakların arılığın hangi bölümünde nasıl konulduğu, nasıl hasat edildiği ve muhafaza koşulları ve ham propolis eldesinin yöntemleri, elde edilen ham propolisten saf propolis eldesinde ekstraksiyon yönteminin tanımlanmasının yapılması gıda hammaddesi olacak propolis için de bir gerekliliktir. Gıda takviyelerinde bileşen olarak kullanılması için üretilen propolisin standartlaştırılmasında üretimin tanımlanmasının oldukça önemli olduğu bu çalışma ile anlaşılmıştır.

Türkiye zengin bir botanik kaynağa sahiptir. 3000'i endemik olmak üzere Türkiye'de 12.000 bitki türünün bulunduğu kaydedilmiştir. Bunların yaklaşık 500'ü bal arıları tarafından tercih edilen nektar bitkileridir. Bu çalışmada incelenen araştırmalardan; Türkiye'den elde edilen propolisin Çin ve Brezilya propolisi ile benzer içeriğe sahip olduğu açıkça anlaşılmıştır. Türkiye'de üretilen propolisin fenolik içeriğinin, dünyada propolis üretiminde en önde gelen Brezilya'da üretilen propolis içeriğiyle benzer polifenolik özellikte olduğu yapılan araştırmalarla kanıtlanmıştır. Bu

durumda Brezilya'da tanımlanan propolis üretimi hakkında yasal düzenlemeler ve propolis elde etme yöntemleri, ham propolisten saf propolis elde edilmesi ile ilgili tanımlamalar yasal otorite tarafından incelenerek mevzuatta yapılacak düzenlemeler ve arıcıların bu konuda eğitimi, ülkemizde uluslararası kalitede propolis üretimini destekleyici bir çalışma olacaktır.

Ülkelerin uyguladıkları gıda mevzuatı incelendiğinde Avrupa Birliği, Amerika, Güney Kore, Türkiye ve daha pek çok ülkenin gıda güvenilirliği kriterlerinin arasında izlenebilirlik en önemli basamaklar arasında yer almaktadır. Propolisin hammadde olarak kullanıldığı gıda takviyelerinin güvenilirlik kriterlerinden izlenebilirliğin sağlanması açısından; propolisin temin edilme yöntem ve tanımlamalarının, en azından hangi coğrafi bölgenin propolisi olduğu hakkında bilginin, ekstraksiyon yöntemi, çözücü özelliklerinin ve toplam polifenolik içeriği hakkında kayıtların ve bilgilerin sorgulanmasının, gıda güvenilirliğinin bir gerekliliği olarak uluslararası mevzuatta yer aldığı görülmüştür.

KAYNAKÇA

- [1] Ayseli, Y.I., Aytekin, N., Büyükkayhan, D., Aslan, I., Ayseli, M.T. (2020). Food Policy, nutrition and nutraceuticals in the prevention and management of COVID-19: Advice for healthcare professionals. *Trends in Food Science & Technology*, 105 (2020), 186-199.
- [2] Celik, C., Gencay, A., Ocsoy, I. (2021). Can food and food supplements be deployed in the fight against the COVID 19 pandemic?. *BBA-General Subjects*, 1865 (2021), 129801.
- [3] Feng, Z., Yang, J., Xu, M., Lin, R., Yang, H., Lai, L., Wang, Y., Wahner-Roedler, D.L., Zhou, X., Shin, K., Salinas, M., Mallory, M., Tang, C., Patchett, D.C., Bauer, B.A., Cui, S. (2021). Dietary supplements and herbal medicine for COVID-19: A systematic review of randomized control trials. *Clinical Nutrition ESPEN*, 44 (2021), 50-60.
- [4] Günalan, E., Cebioglu, İ.K., Çonak, Ö. (2021). The popularity of the Biologically-Based Therapies During Coronavirus Pandemic Among the Google Users in the USA, UK, Germany, Italy and France. *Complementary Therapies in the Medicine*, 58 (2021), 102682.
- [5] Berretta, A.A., Siveria, M.A.D., Capcha, J.M.C., De Jang, D. (2020). Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131 (2020), 110622.
- [6] Silveria, M.A.D., De Jong, D., Berretta, A.A., dos Santos Galvao, E.B., Riberio, J.C., Cerqueira-Silva, T., Amorim, T. C., da Conceição, L. F. M. R., Gomes, MM. D., Teixeira, M. B., de Souza, S.P., dos Santos, M.H.C.A., San Martin, R.L.A., de Oliveira Silva, M., Lirio, M., Moreno, L., Sampaio, J.C.M., Mendonça, R., Ultchak, S.S., Amorim, F.S., Ramos, J.G.R., Batista, P.B.P., da Guarda, S.N.F., Mendes A.V.A., de Hora Passos, R. (2021). Efficacy of Brazilian green propolis (EPP-AF®) as an adjunct treatment for hospitalized COVID-19 patients: A randomized, controlled clinical trial. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 138 (2021), 111526.
- [7] Sforcin, J.M. (2007). Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 113 (2007), 1-14.
- [8] Sorkun, K., Yılmaz, B., Özkırım, A., Özkök, A., Gençay, Ö. (2012). Yaşam için Arılar (1. Baskı) Ankara, Önder Matbaacılık Ltd. Şti.
- [9] Anjum, S.I., Ullah, A., Khan, K.A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., Bashir, M.A., Tahir, M., Ansari, M.J., Ghramh, H.A., Adgoba, N., Dash, C.K. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26 (2019), 1695- 1703.
- [10] Sforcin, J.M., Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?. *Journal of Ethnopharmacology*, 133 (2011), 253-260.
- [11] Yeşilada, E. (2019). Apiterapi. (4. Baskı). İstanbul: Hayykitap.

- [12] Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100 (2005), 114-117.
- [13] İnci, A. (1999). Ana Arı Üretimi. (1. Baskı) Ankara. Önder Matbaacılık Ltd. Şti.
- [14] Saygı, Y. (2007). Arıcılık. (2. Baskı). Ankara Tarım ve Köyişleri Bakanlığı.
- [15] Doğaroğlu, M., Doğaroğlu, O.K. (2015). Modern Arıcılık Teknikleri. (6. Baskı). İstanbul. Anadolu Matbaa.
- [16] Sarıkahya, N.B., Gören, A.C., Okkalı, G.S., Çöven, F.O., Orman, B., Kırıcı, D., Yücel, B., Kışla, D., Demirci, B., Altun, M., Önem, A.N., Nalbantsoy, A. (2021). Chemical composition and biological activities of propolis samples from different geographical regions of Turkey. *Phytochemistry Letters*, 44 (2021), 129-136.
- [17] Kutluca, S. (2003) Propolis Üretim Yöntemlerinin Koloni Performansı ve Propolisin Kimyasal Özellikleri Üzerine Etkileri. Ulusal Tez Merkezi (Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni ABD)
- [18] Freitas, A.S., Cunha, A., Cardoso, S.M., Oliveira, R., Aguiar, C.A. (2019). Constancy of the bioactivities of propolis samples collected on the same apiary over four years. *Food Research International*, 119 (2019), 622-633.
- [19] Aldana-Mejia, J.A., Ccana – Coopatinta, G.V., Ribeiro, V.P., Arruda, C., Veneziai, R.C.S., Ambrasio, S.R., Bastos, J.K. (2021). A validated HPLC-UV method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian red propolis and *Dalbergia ecastaphyllum*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 198 (2021), 114029.
- [20] Rojczyk, E., Klama-Baryla, A., Labus, W., Wilenska – Kucharzewska, K., Kucharzewski, M. (2020). Historical and modern research on propolis and its application in wound healing and other fields of medicine and contributions by Polish studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 262 (2020), 113159.
- [21] Ozdal, T., Ceylan, F.D., Eroglu, N., Kaplan, M., Olgun, E.O., Capanoglu, E. (2019). Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis. *Food Research International*, 122 (2019), 528-536.
- [22] Russo, M., Maccia, S., Spagnuola, C., Tedesco, I., Russo, G.L. (2020). Roles of flavonoids against coronavirus infection. *Chemico-Biological Interactions*, 328 (2020), 109211
- [23] Montenegro – Landivar, M.F., Tapia – Quiros, P., Vecino, X., Reig, M., Valderrama, C., Granados, M., Cortina, J.L., Sarina, J. (2021). Polyphenols and their potential role to fight viral diseases: An overview. *Science of the Total Environment*, 801 (2021), 149719.
- [24] Carocha, M., Ferreira, C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and

analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51(2013), 15-25.

- [25] Barreca, D., Trombetta, D., Smeriglio, A., Mandalari, G., Romeo, O., Felice, M.R., Gattuso, G., Nabavi, S.M. (2021). Food flavonols: Nutraceuticals with complex health benefits and functionalities. *Trends in Food Science & Technology*, 117(2021), 194-204.
- [26] Yosri, N., Abd El-Wahed, A., Ghonaim, R., Khattab, O.M., Sabry, A., Ibrahim, M.A.A., Moustafa, M.F., Guo, Z., Zou, X., Algethami, A.F.M., Masry, S.H.D., AlAjmi, M.F., Afifi, H.S., Khalifa, S.A.M. (2021). Anti-Viral and Immunomodulatory Properties of Propolis: Chemical Diversity, Pharmacological Properties, Preclinical and Clinical Applications, and In Silico Potential against SARS-CoV-2. *Foods*, 10 (1176), 1-47.
- [27] Irigoiti, Y., Navarro, A., Yamul, D., Libonatti, C., Tabera, A., Basualdo, M. (2021) The use of propolis as functional food ingredient; A review. *Trends in Food Science & Technology*, 115 (2021), 297-306.
- [28] Özkök, A., Keskin, M., Samancı, A.E.T., Önder, E.Y., Takma, Ç. (2021). Determination of antioxidant activity and phenolic compounds for basic standardization of Turkish propolis. *The Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 64 (37).
- [29] Arslan, D., Aydın, M., Türker, S. (2021). Extraction Methods of Medicinal and Aromatic Plants, Its Use in Foods and Evaluation in Food Supplement Field. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 9 (5), 926-936.
- [30] Zor, D.L. (2004). Ayırma ve Saflaştırma İşlemleri II. Ünite. Eskişehir. A.Ü. Yayını.
- [31] Belwal, T., Ezzat, S.M., Rastrelli, L., Bhatt, I.D., Daglia, M., Baldi, A., Devkota, H.P., Orhan, İ.E., Jayangta, K.P., Das, G., Anandharamakrishnan, C., Gomez-Gomez, L., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., Atanasov, A.G. (2018). A critical analysis of extraction techniques used for botanicals; Trends, priorities industrial uses and optimization strategies. *Trends in Analytical Chemistry*, 100 (2008), 82-102.
- [32] Liao, N., Sun, L., Wang, D., Chen, L., Wang, J., Qi, X., Zhang, H., Tang, M., Wu, G., Chen, J., Zhang, R. (2021) Antiviral properties of propolis ethanol extract against norovirus and its application in fresh juices. *LWT-Food Science and Technology*, 152 (2021), 112169.
- [33] Cunha, I.B.S., Sawaya, A.C.H.F., Caetano, F.M., Shimizu, M.T., Marcucci, M.C., Drezza, F.T., Povia, G.S., Carvalho, P.O. (2004) Factors That Influence the Yield and Composition of Brazilian Propolis Extracts. *J-Braz. Chem. Soc.*, Vol. 15. No-6, 964-970, 2004.
- [34] Büyüktünel, E. (2012). Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* (2012), 209-242.
- [35] Dias, A.L.B., de Aguiar, A.C., Rostagno, M.A. (2021). Extraction of natural products using supercritical fluids and pressurized liquids assisted by

- ultrasound: Current status and trends. *Ultrasonics Sonochemistry*, 74 (2021), 105584.
- [36] Ristivojević, P., Dimkić, I., Guzelmeric, E., Trifković, J., Knezević, M., Beric, T., Yeşilada, E., Milojkovic-Opsenica, D., Stankovic, S. (2018). Profiling of Turkish propolis subtypes; Comparative evaluation of their phytochemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities. *LWT-Food Science and Technology*, 95 (2018), 367-379.
- [37] Guzelmeriç, E., Yuksel, P.I., Yaman, B.K., Sipahi, H., Celik, C., Kırmızıbekmez, H., Aydın, A., Yeşilada, E. (2021). Comparison of antioxidant and anti inflammatory activity profiles of various chemically characterized Turkish propolis sub-types; Which propolis type is a promising source for pharmaceutical product development?. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 203 (2021), 114196.
- [38] Pobiega, K., Krasniewska, K., Gniewosz, M. (2019). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality- A review. *Trends in Food Science & Technology*, 83 (2019), 53-62
- [39] Biscaia, D., Ferreira, S.R.S. (2009). Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. *The journal of Supercritical Fluids*, 51 (2009), 17-23.
- [40] Sawaya, A.C.H.F., Cunha, I.B.S., Marcucci, M.C., (2011). Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*, (2011), 5-27.
- [41] Coppens, P., da Silva, M.F., Pettman, S. (2006). European regulations on nutraceuticals, dietary supplements and functional foods: A framework based on safety. *Toxicology*, 221 (2006), 59-74.
- [42] Vujic, M., Pollak, L., (2015). Composition, labelling, and safety of food supplements based on bee products in the legislative framework of the European Union- Croatian experiences. *Arh Hig Rada Toksikol*, (2015); 66:243-249
- [43] Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council of 10 June 2002 on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements. *Official Journal L* 183, 12/07/2002, pp. 0051-0057.
- [44] Takviye Edici Gıdaların İthalatı, Üretimi, İşlenmesi ve Piyasaya Arzına İlişkin Yönetmelik. *Resmi Gazete* 02/05/2013, sayı: 28635.
- [45] Türk Gıda Kodeksi Takviye Edici Gıdalar Tebliği. *Resmi Gazete* 16/08/2013, sayı:28737.
- [46] Takviye Edici Gıdaların Onay İşlemleri Uygulama Talimatı Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü Mevzuatı. 08/08/2019.
- [47] Escriche, I., Juan-Borras, M., (2018). Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. *Food Research International*. 106 (2018), 836-841.
- [48] Arslan, M., Sevgiler, Y., Güven, C., Murathan, Z.T., Erbil, N., Yıldırım, D.,

- Büyükleye, M., Karadaş, Ş., Çelik, R., Rencüzoğulları, E., (2021). Chemical and biological characteristics of propolis from *Apis mellifera caucasica* from the Ardahan and Erzurum provinces of Turkey: a comparative study. *Arh Hig Toksikol.* 72:53-69
- [49] Coppens, P., Pettman, S., (2014), European Regulations on Food Supplements, Fortified Foods, Dietetic Foods, and Health Claims.13. bölüm. *Nutraceutical and Functional Food Regulations in the United States and Around the World.* Elsevier Inc.,201-219.
- [50] Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B.J., Cunha, I.B.S., Danert, C., Eberlin, M.N., Falcao, S., Isla, M.I., Moreno, M.I.N., Papotti, G., Popova, M., Santiago, K.B., Salas, A., Sawaya, A.C.H.F., Schab, N. V., Sforcin, J.M., Simone Finstrom, M., Trusheva, B., Vilas-Boas, M. Wilson. M, Zampini, C. (2016) Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research.*, 4-46
- [51] Cui, J., Duan, X. Ke, L., Pan, X.,Liu, J., Song, X., Ma, W., Zhang, W., Liu, Y., Fan , Y.(2022) Extraction, purification, structural character and biological properties of propolis flavonoids: A review.*Fitoterapia* 157 (2022), 105106.
- [52] Krell, R., (1996) Value –added products from beekeeping, *FAO Agricultural Services bulletin* No:124 Food and Agriculture Organisation of the United Nations Rome 1996.