



**T.C.  
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROPOLİSTEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN İLAÇ  
KORUYUCU MADDESİ OLARAK KULLANILMASI VE  
FORMÜLASYONU**

**DİCLE KURT**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. HALİL İBRAHİM UĞRAŞ**

**DÜZCE, 2020**

**T.C.**  
**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROPOLİSTEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN İLAÇ**  
**KORUYUCU MADDESİ OLARAK KULLANILMASI VE**  
**FORMÜLASYONU**

Dicle KURT tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

Düzce Üniversitesi

**Jüri Üyeleri**

Prof. Dr. Halil İbrahim Uğraş

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Halil İbrahim Uğraş

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Ertuğrul KAYA

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Turgut KILIÇ

Balıkesir Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 31/08/2020

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

31 Ağustos 2020

Dicle KURT

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimimde ve bu tezin hazırlanmasında gösterdiği her koşulda her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ'A en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili eşim Sezer KURT, ablam Züleyhan BARAN ve annem Salihe BARAN olmak üzere, babam ve abime ve çalışmalarımnda bana verdikleri destek ve teknik bilgi dolayısıyla Nobel İlaç San. Ve Tic A.Ő. Ar-Ge Grup Müdürü sayın Dr. Ecz. Abdullah USLU'ya, Kalite Kontrol Uzmanı sayın Esra YÜKSEL ve Mikrobiyoloji Őefi sayın Mine GÜRBÜZ'e, çalışmalarımnda desteğini esirgemeyen ve her koşulda destekleyen sevgili Őefim Dış Ticaret Projeleri Farmasötik Ar-Ge Őefi sayın Berna ÖKÇELİK ERDOĞAN'a, çalışmalarımnda katkı ve desteklerini esirgemeyen Öğr. Gör. Elif Sine Düvenci, Öğr. Gör. Bora KARAGÜL ve Öğr. Gör. DR. Őeref KARADENİZ'e ve Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Sekreterliği Çalışanlarına en içten dileklerle teşekkür ederim.

**31 Ağustos 2020**

**Dicle KURT**

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR.....	ix
SİMGELER .....	xi
ÖZET .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. TIBBİ BİTKİLER.....	3
2.1.1. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Tarihçesi ve Tanımları .....	3
2.1.2. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Yerel ve Uluslararası Üretimi ve Ticareti..	4
2.1.3. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanım Alanları .....	6
2.2. PROPOLİS.....	7
2.2.1. Propolisin Tarihçesi ve Tanımı.....	7
2.2.2. Propolisin Bileşimi ve Kaynakları .....	8
2.2.3. Propolisin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri ve Bunları Etkileyen Faktörler .....	15
2.2.4. Propolisin Biyolojik ve Farmasötik Özellikleri ve Bu Alanlarda Kullanımı .....	15
2.2.5. Propolisin Çeşitli Ekstraksiyon Yöntemleri ve Bunların Etkileri .....	19
2.3. İLAÇ .....	20
2.3.1. İlacın Tanımı ve Genel Özellikleri.....	20
2.3.2. İlaç Etken Madde ve Eksipiyen Tanımı.....	23
2.3.3. İlaç Koruyucu Maddelerin Tanımı.....	23
2.3.4. İlaç Koruyucu Sınıflandırılması ve Etki Mekanizması .....	24
2.3.5. Farmasötik Süspansiyonlarda Kullanılan Koruyucular .....	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	28
3.1. PROPOLİS ÖRNEKLERİ.....	28
3.2. PROPOLİS EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI.....	28
3.2.1. Sulu Ekstraksiyon Hazırlanması .....	28
3.2.2. Etanolik Ekstraksiyon Hazırlanması .....	31
3.3. PROPOLİS EKSTRELERİNİN TOPLAM FLAVANOİD VE FENOLİK MADDE TAYİNİ.....	32
3.3.1. Toplam Fenolik Madde ve Flavanoid Tayini için Numune Hazırlama ..	32
3.3.2. Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenolik Madde Tayini .....	33

3.2.3. Toplam Flavanoid İçeriğinin Tayini.....	34
3.4. ORAL SÜSPANSİYONUN ÖZELLİKLERİ, KORUYUCU İÇERİĞİ VE ÜRETİM METODU .....	35
3.5. MİKROBİYOLOJİK ANALİZLER.....	37
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	39
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	49
6. KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	65



## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Çeşitli propolis resimleri. ....	7
Şekil 2.2. Çeşitli propolis resimleri. ....	8
Şekil 2.3. Propolisteki en yaygın fenolik bileşikler. ....	10
Şekil 3.1. Ham propolis. ....	28
Şekil 3.2. Ham propolis. ....	28
Şekil 3.3. Sulu ekstrakt. ....	29
Şekil 3.4. Sulu ekstrakt. ....	29
Şekil 3.5. Sulu ekstrakt. ....	30
Şekil 3.6. Sulu ekstrakt. ....	30
Şekil 3.7. Sulu ekstrakt. ....	30
Şekil 3.8. Sulu ekstrakt. ....	31
Şekil 3.9. Etanolik ekstrakt 1. ....	31
Şekil 3.10. Etanolik ekstrakt 2. ....	31
Şekil 3.11. Etanolik ekstrakt 3. ....	32
Şekil 3.12. Amberli cam şişede numune. ....	32
Şekil 3.13. Fenolin reaktifinin yapısı. ....	33
Şekil 3.14. Toplam polifenol standart grafiği. ....	34
Şekil 3.15. Toplam flavanoid ( $\mu\text{gQE}/\text{mg}$ olarak) standart grafiği. ....	35
Şekil 3.16. Etanolik ve sulu ekstrakt içeren test ürünler. ....	36
Şekil 3.17. Etanolik ekstrakt içeren test ürün. ....	36
Şekil 3.18. Homojenizasyon işlemi. ....	36
Şekil 4.1. Mikrobiyolojik analiz sonuçları. ....	46

## ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 2.1. Ham propolisin kimyasal bileşimi.....	9
Çizelge 2.2. Dünya genelindeki yaygın propolis kaynakları, orijinleri ve kimyasal özellikleri.....	11
Çizelge 2.3. Türkiye’deki bazı bölgelere ait propolislerin kimyasal özellikleri.....	12
Çizelge 2.4. Yığılca Yöresi propolisinin %70’lik etanolik ekstrakt içeriği.....	13
Çizelge 2.5. Farklı propolis kaynaklarına ait bileşikler ve bunların biyolojik aktiviteleri .....	16
Çizelge 2.6. Farmasötik ürünlerde en sık kullanılan koruyucular ve kullanılan formlara göre içerik yüzdeleri .....	25
Çizelge 4.1. Flavanoid madde analiz işlemi. ....	42
Çizelge 4.2. Fenolik madde analiz işlemi. ....	42
Çizelge 4.3. Toplam fenolik-flavanoid miktarları. ....	43
Çizelge 4.4. İklim-stabilite koşulları çizelgesi.....	44
Çizelge 4.5. Ürün içerik ve isim çizelgesi. ....	46
Çizelge 4.6. E.coli için mikrobiyal testler. ....	47
Çizelge 4.7. S. aureus için mikrobiyal testler. ....	48
Çizelge 4.8. İzin verilen maksimum parçacık sayısı/m <sup>3</sup> .....	48

## KISALTMALAR

A.B.D.	Ana bilim dalı
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ANDA	Kısaltılmış yeni ilaç başvurusu
API	Active pharmaceutical ingredient
BHA	Butil hidroksianisol
BHT	Butillenmiş hidroksitoluen
BLA	Biyolojik lisans başvurusu
CAPE	Kafeik asit fenil ester
CDER	İlaç değerlendirme ve araştırma merkezi
DF	Dozaj formu
DNA	Deoksiribonükleik asit
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Disodyum etilendiamintetraasetik asit
EP	European Pharmacopoeia
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Bakanlığı
GA	Gallik asit
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
H. pylori	Helicobacter pylori
HPLC	High pressure liquid chromatography
ICH	International Conference on Harmonisation
IND	Araştırma amaçlı yeni ilaç
IR	Infrared
ISO	International Organization for Standardization
KF	Karl Fischer
M.Ö.	Milattan önce
MCA	MacConkey agar
MCB	MacConkey broth
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyonu
MSA	Mannitol salt agar
NDA	Yeni ilaç başvurusu
OTC	Reçetesiz satılan ilaçlar
Ph. Eur.	European Pharmacopoeia
PP	Polipropilen
QE	Kuersetin
RH	Bağıl nem
RNA	Ribonükleik asit
RoA	Uygulama yolu
S. aureus	Staphylococcus aureus
SDA	Sabouraud dextrose agar
spp.	Türleri

TSA	Tryptic soy agar
TSB	Tryptic soy broth
UN Comtrade	Cenevre Uluslararası Ticaret Merkezi
USDA	Amerika Birleşik Devletleri Tarım Dairesi
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultraviolet
UV-VIS	Ultraviolet visible
WHO	Dünya Sağlık Örgütü



## SİMGELER

g	Gram
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
pH	Power of hydrogen
pKa	Asit ayrışma sabitinin logaritması
ppm	Parts per million
W	Watt
$\lambda$	Dalga boyu
$\mu\text{L}$	Mikrolitre
%	Yüzde
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece

## ÖZET

### PROPOLİSTEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARIN İLAÇ KORUYUCU MADDE OLARAK KULLANILMASI VE FORMÜLASYONU

Dicle KURT  
Düzce Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi  
Danışman: Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ  
Ağustos 2020, 64 sayfa

Bu çalışmada Düzce propolisinin etanolik ve sulu ekstraktları hazırlanmış, bu ekstraktların fenolik ve flavanoid madde miktarları belirlendikten sonra farmasötik bir oral süspansiyon formülasyonunda paraben bazlı yapay koruyucu yerine antimikrobiyal koruyucu olarak kullanılmışlardır. Ekstraktların flavanoid ve fenolik madde tayinleri UV Spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Etanolik ekstraktların fenolik madde ve flavanoid içeriği sulu ekstraktlardan yüksek bulunmuştur. Formülasyonlarda piyasada yapay koruyucu olarak paraben kullanılan ürünlerin yapay koruyucu miktarlarınının 0.5, 1, 2 ve 4 katı kullanılarak test ürünler üretilmiştir. Geliştirilen formülasyonlar C derece farmasötik üretim şartlarında gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak farmasötik oral bir süspansiyon referans bir ürün seçilmiş ve ayrıca koruyucusuz formülasyon da geliştirilerek takip edilmiştir. Ürünler 40 °C’de %75 bağıl nem içeren etüvlerde 1 hafta, 2 hafta, 1 ay ve 2 ay olmak üzere stres koşullarında bekletilerek belirtilen periyotlarda mikrobiyolojik analizlere alınmışlardır. Mikrobiyolojik analizlerde Avrupa Farmakopesi (EP) baz alınarak ekim ortamları belirlenmiş ve hazırlanmıştır. Mikrobiyolojik ekim sonuçlarına göre, son periyot olan 2. ayın sonuna kadar referans ürünle aynı etkiyi etanolik ekstrakt göstermiştir. Bu ekstraktın 2 ve 4 katı kullanımlarının olduğu formülasyonlarda 2 ay sonunda üreme gözlemlenmemiştir. Sulu ekstraktlarda ise tüm konsantrasyonlarda üreme gözlemlenmiştir. Bu çalışmaya göre etanolik propolis ekstresi, oral süspansiyonlarda antimikrobiyal koruyucu eksispiyan olarak değerlendirilebilir.

**Anahtar sözcükler:** Propolis, Antimikrobiyal, Oral süspansiyon, Koruyucu madde, Ekstraksiyon.

## ABSTRACT

### FORMULATIONS AND USING AS MEDICINAL PRESERVATIVES OF THE PRODUCTS WHICH EXTRACTED FROM PROPOLIS

Student Dicle KURT

Düzce University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Chemistry

Master's Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

August 2020, 64 pages

In the study, ethanolic and aqueous propolis extracts was prepared which xere collected from Duzce. After the extracts' phenolic and flavonoid matters were determined, they were used as preservative instead of artifical paraben base preservatises as an antimicrobial preservative in pharmaceutic oral suspension. Phenolic and flavonoids concentrations were determined with UV spectrophotometer. Phenolic and flavonoids content of the ethanolic extract were grater than the aqueous extract. The extracts were used as 0.5, 1, 2 and 4 times grater than artifical preservative content of the markets products which have artifical preservatives as parabens. Approved formulations were produced in C grade production area. A pharmaceutic oral suspension was choosen as control group. Additionally, an artifical preservatives free suspension was formulated and produced. The products were kept under stress conditions where have 40 °C temperature and 75% relative humidity in incubator and analysed as microbiologically with 1 week, 2 week, 1 month and 2 months periods. The microbiological analyses were determined according to European Pharmacopeia (EP). According to microbiological analyses, ethanolic extract had same effect wtih referance product until the second month whic were the last period of the microbiological analysis. The products which had propolis 2 and 4 times greater than artifical preservatives had no microbiological growth at the end of the 2 months preiod. The aqueous extract had microbiological growth in all of the periods. According to the study, ethanolic propolis extract can be evaluated as a preservative in oral suspensions.

**Keywords:** Propolis, Antimicrobial, Oral suspension, Preservative, Extraction.

# 1. GİRİŞ

İlaç sanayiinde kullanılan etken ve yardımcı maddelerin büyük çoğunluğunu sentetik maddeler oluşturmaktadır. Sentetik veya yarı sentetik maddelerin advers etkilerinin fazla olması, bu maddelerin yerine kullanılabilen olan doğal ve yan etkisiz veya yan etkisi en az olacak maddelerin kullanımını ön plana çıkarmaktadır.

Günümüzde kullanım sıklığı en yüksek olan alternatifler tıbbi bitkiler ve arı ürünleridir. Son yıllarda bu iki ana başlığın popülaritesinin artmasıyla birlikte kullanım ve tercih edilme sıklıklarında da belirgin bir artış yaşanmıştır. Aslında kullanımları milattan öncesine dayanan bu doğal farmasötiklerin yeniden gündeme gelmesi özellikle doğala dönüş akımıyla birlikte ivmelenmiştir.

Yanlış ilaç kullanımlarının artması bazı moleküllere dayanıklı hale gelen mikroorganizmaların oluşmasına yol açmıştır ve bu durum yeni antimikrobiyal ajanların kullanılmaya başlanması için ön ayak olmuştur. Özellikle antibiyotik kullanımının insanlar, kümes ve besi hayvanlarında artmasıyla ve bilinçsiz kullanımıyla bu durum hız kazanmıştır.

Arıcılık ve tıbbi bitkilerin Türkiye’de yaygın olması ülkemizi bu noktada öne çıkarmaktadır. Tıbbi bitkilerin gerek endemik gerekse ıslahlı yetiştirme çalışmaları, bu bitkilere ulaşım kolaylığını arttırmaktadır. Yaklaşık 3800 tanesi endemik olmak üzere 12000 civarında bitki taksonu ülkemizde bulunmaktadır (Constantinides vd., 2004).

Propolis arıların bitkinin çeşitli kısımlarından topladığı reçine, bitki özü ve farklı özler içeren bir karışımdır, ayrıca arılar da çeşitli enzim ve salgılarını kullanarak bu karışıma katkıda bulunurlar (Castaldo & Capasso, 2002). Propolisin iyileştirici ve antimikrobiyal özelliği de bu noktada oluşmaktadır.

Bal arıları bu maddeyi petek yapısında, kovanın çeşitli bölgelerinin onarılmasında ve güçlendirilmesinde, kovanın giriş çıkışlarının kapatılması veya küçültülmesinde kullanırken bir yandan da propolis onları mikrobiyolojik etmenlerden korumaktadır (Castaldo & Capasso, 2002).

Arı ürünleri kullanılarak yapılan tedavinin Apiterapi olarak adlandırılmaktadır ve arı

yetiştiriciliğiyle aynı yaşıdır (Hamdy vd., 1989). Çinli kaynaklara göre 2000 yıl öncesinden beri bu tedavi şekli kullanılmaktadır (Bayrak, 2005). Arı sütü, bal, polen ve propolis çeşitli oranlarda kullanılarak Apiterapi yoluyla fayda sağlamaya devam etmektedir (Yücel, 2004).

Propolisin içeriği hasat zamanı ve metoduna göre farklılık göstermektedir. Olabildiğince saf propolis elde edebilmek için zaman içerisinde çeşitli yöntemler geliştirilmiştir ve bunlardan en yaygın olanı ahşap tuzaklı metottur (Mani vd., 2006). Ancak propolisin riskli yönlerinden biri, arıların propolis üretmek için uygun hammadde bulamadıklarında reçinensi yapıyı sağlayabilmek adına petrol türevi olan zift ve asfalt gibi maddelere yönelmeleridir (Bankova vd., 2000). Bu durumda tıbbi olarak kullanılmaları sakıncalıdır ve kullanılmadan önce analiz edilmesi, standardizasyonu sağlamak adına çok önemlidir.

Ülkemizde endemik bitki nüfusunun yoğun olması, propolisin kimyasal bileşiminin de bölgesel farklılıklara sahip olmasına yol açmaktadır. Bu çalışmada, Karadeniz Bölgesi, Düzce Yöresi'nin farklı bölgelerine ait propolis kaynakları bir araya getirilerek kullanılmıştır. Kimyasal analizlerin ardından, farmasötik ürün içerisinde antimikrobiyal özelliğinden faydalanılarak ilaç koruyucu madde olarak çeşitli oranlarda kullanılmış ve ardından mikrobiyolojik analizleri yapılmıştır. Sonuçlar, propolisin ilaç koruyucu madde olarak alternatif bir ürün şeklinde kullanılıp kullanılmayacağını kanıtlamak amacıyla tartışılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. TIBBİ BİTKİLER

#### 2.1.1. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Tarihçesi ve Tanımları

Bu iki terim bir arada kullanılsa da anlamca farklılıklara sahiptir; tıbbi bitkiler tıpkı ilaçlar gibi teşhis, tedavi veya önleyici amaçlarla kullanılırken, aromatik bitkilerse sahip oldukları aroma sebebiyle hoş koku sağlama ve dolayısıyla kozmetik alanda kullanım, tat verme gibi özellikleriyle ön plana çıkar (Başer, 1998). Tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanımını ve yetiştiriciliğini, ülkemizde ve dünyada yaygındır. Hatta bu bitkilerin Paleolitik çağlardan beri canlılar tarafından kullanıldığı belirlenmiştir (Lewin, 2000). Ülkemize oldukça yakın bir mesafede bulunan Irak'ın kuzey bölgesindeki bir mağarada, 1960'lı yılların başında yapılan bir kazıda, Neandertal mezarlarına ait kalıntılarda, mor sümbül, kanarya otu, peygamber çiçeği, gül, hatmi, efedra ve civanperçemi gibi bitkilere ait türler, naaşa birlikte bulunmuştur (Lewin, 2000). Bu türlerin zamanımızda dahi tedavi amacıyla kullanılması ve o dönemdeki toplumlarda ölümden sonra yaşama tekrar dönüldüğü düşüncesinin yaygın inanç olduğu birleştiğinde, bitkilerin bir çeşit sınıflandırmaya tabi tutularak sınıflandırıldığı ve kullanıldığı düşünülmektedir (Faydaoğlu & Sürücüoğlu, 2011).

Bitkilerler tedavi anlamına gelen Fitoterapi (phytos=bitki, therapy=tedavi) kelimesinin ilk kez La Presse Medical adlı dergide Fransız hekim Henri Lenclerc (1870-1953) tarafından kullanıldığı düşünülmektedir (Şarışen & Çalışkan, 2005). Fitoterapiye artan ilgiyle beraber tedavi şekli günümüzde yeniden popülerleşmiş ve Almanya'da %52, Amerika'da %86 kullanılma sıklığıyla dermatoloji kliniklerinde yerini almıştır (Ernst, 2000). Ülkemizdeyse güncel sayı bilinmemekle birlikte artışlar gözlemlenmektedir (Kurt vd., 2004).

Aromaterapi, fitoterapinin bir branşıdır, ancak bu tedavi şeklinde kullanılan materyaller esansiyel yağlardır (Price, 2011). Herhangi bir bölgeye ait olmamakla birlikte, her yörede kendine özgü tedavi şekilleriyle yer bulmuştur; uçucu yağların koklatılması, masaj, kompres, banyo gibi yollarla tedaviler sağlanmıştır (Buckle, 2003).

Sanayi Devrimi'nin olması ve hızla sanayileşmenin kimya alanındaki gelişmeyi de

hızlandırmasıyla, 1900'lerin başlarında ilaç sanayisinde kullanım oranı %40'a yaklaşan bitkisel kaynakların kullanımını azalmaya başlamıştır. 1970'in ortasına gelindiğindeyse bu oranı %5'lere kadar geriletmiştir (Craker & Gardner, 2003). Bu düşüşte sentetik etken madde üretiminin gelişen teknolojiyle birlikte hızlanması ve sentetik maddelerin elde ediminin daha hızlı olması en büyük etkenler olarak rol oynamıştır.

Yakın zamanda bu bitki türlerinin 20000 civarını bulduğu Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından bildirilmiştir. Dünya piyasasındaki yeriye yaklaşık 60 milyar dolardır (Kumar, 2009).

### **2.1.2. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Yerel ve Uluslararası Üretimi ve Ticareti**

Birçok tıbbi ve aromatik bitki gıda, kozmetik, ilaç ve boya gibi çeşitli kimya alanlarında, farklı özellikleri sebebiyle kullanılmaktadırlar. Dolayısıyla bu tüketimin getirdiği bir talep oluşmakta ve arz gerçekleştirebilmek için üretim konusunun belirli bir standarda sahip olması gerekmektedir. Dünyada yaklaşık olarak bilinen bitki sayısı 420 bin civarındadır, bunlardan 20000 kadarı tıbbi, 30000 kadarıysa aromatiktir. Ülkemizde tıbbi ve aromatik bitki sayısı 500 iken, dünyada bu sayılar Vietnam 1800, Amerika 2500 ve Çin'de 4900 ile en yüksek sayıya sahiptir (Schippmann vd., 2002). Dünyada en çok ihracatı yapılan tıbbi ve aromatik bitkiler 2009'da yılında yayınlanan bir Birleşmiş Mille verisine göre şu şekildedir salep, kahve ve ilca olarak kullanılan bitkilerdir (Schippmann vd., 2002).

Ülkemizde ithalat ve ihracatı yapılan bitkilerin toplam sayısı 347'dir, bunun %30'u ihracatta pay sahibidir (Özhatay & Koyuncu, 1998). Türkiye İstatistik Kurumu'nun 2009 yılındaki verilerine göre, en çok tarımı yapılan tıbbi bitkiler ise anason, kimyon, kekik, çemen, nane, dereotu ve şerbetçiotudur. En çok ihracatı yapılan tıbbi bitkiler ise kekik, defne, adaçayı, anason, kimyon, kişniş, rezene, kapari, ıhlamur, biberiye, zerdeçal, nane, keçiboynuzu meyan köküdür.

Bunların dışında özellikle tat ve aroma için parfüm, temizlik, gıda ve ilaç sektöründe sıklıkla kullanılan uçucu yağların da pazarda kendilerine ait özel bir payı bulunmaktadır. Üretimlerinin yarısı gelişmekte olan ülkeler, 1/4'ü Balkan ülkeleri ve kalanıysa gelişmiş ülkelerde yapılmaktadır (Bayram vd., 2010). En büyük ithalatçılarsa üretimle ters orantılı olarak gelişmiş ülkelerdir; ABD, Japonya; İsviçre ve çeşitli Avrupa ülkeleri aşağıdaki ürünlerin ithalatında ilk sıralarda yer almaktadır. Sırasıyla en çok ihracatı ve ithalatı yapılan ürünler ihracatta bergamut yağı, portakal yağı, limon yağı, misket limonu yağı

(lime), diğler turunçgil yağları, geranium yağı, yasemin yağı, lavanta yağı, acı nane yağı, güve otu (vetiver) yağı, turunçgil meyveleri, dışındaki diğler yağlar, rezinoitler, konkret ve absoluleri içeren terpensiz uçucu yağlardır. İthalatta ise bergamut yağı, portakal yağı, limon yağı, misket limonu yağı (lime), diğler turunçgil yağları, geranium yağı, yasemin yağı, lavanta yağı, acı nane yağı (mentha piperita), diğler nane yağları, güve otu (vetiver) yağı, turunçgil meyveleri, dışındaki diğler yağlar, rezinoitler, konkret ve absoluleri içeren terpensiz uçucu yağlar.

İthalat ve ihracatı bu denli yaygın olan tıbbi ve aromatik bitkilerin birden fazla da üretim metodu bulunmaktadır. Bunlardan ilki ülkemizde de yaygın olarak kullanılan doğadan toplama yöntemidir, bu yöntem Avrupa'da da halen yaygın olmasının sebeplerinin başında ekonomik olarak düşük maliyetli olmasıdır (Bayram vd., 2010). Ancak bu durum bilinçsiz toplayıcılık yüzünden, endemik türlerin yok olmasına, doğal floranın bozulmasına ve erozyon gibi önemli çevre zararlarına sebep olmaktadır (Özhatay & Atay, 1997).

Bir diğler yöntem ise organik üretilimdir. Organik tarımın diğler isimleriye, ekolojik ve biyolojik tarımdır (Regulation, 1991). FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Bakanlığı)'da organik gıda tanımına baktığımız USDA (Amerika Birleşik Devletleri Tarım Dairesi)'yı refere etmektedir. Buradaki tanıma göre ise organik tarım "Toprağı işlerken sentetik veya sentetik içerikli gübre, büyüme düzenleyiciler, tarım ilaçları ve hayvan yemleri kullanımı tamamen kaldırılmalı veya kısıtlanmalıdır ve bunların yerine hayvan veya bitki gübreleri, organik atıklar kullanılmalı ve biyolojik olarak zararlılarla mücadele edilmelidir." Şeklinde açıklanmıştır. Nacak yasal mevzuatların fazla olması bu üretim biçiminin ülkemizde henüz yaygınlaşmasına neden olmuştur ve halen kısıtlı bir alandır.

Yukarıdaki sebeplere ek olarak belirli bir miktarda ve kalitede ürün elde edebilmek için doğadan toplama yöntemi yetersiz kalmaktadır. Bu noktada devreye kültür yoluyla üretim girmektedir. Böylelikle hem bitkilerin genleri koruma altına alınmış olup hem de ülke açısından ekonomik fayda sağlayacak sınırlı doğal üretim alanları olan potansiyeli yüksek ürünlerin üretilmesi sağlanmaktadır. Ülkemizde genellikle baharat kategorisine giren kimyon, rezene, hardal, nane gibi bitkilerin kültürleri yapılırken, doğal florasında bulunmasına rağmen yağı veya bitkisi ithal edilen nane yağı, melissa, kafein gibi maddeler de bulunmaktadır (Özhatay & Atay, 1997).

Çok farklı sanayi alanlarında kullanılan tıbbi ve aromatik bitkilerin arasına kesin sınırlar

koyarak sınıflandırmak çok mümkün görünmemektedir. Bu sebeple bunları sınıflandıran bir sistem henüz oluşmamıştır. Hatta ihracatta kullanılan her ürüne özel başlıklar tıbbi ve aromatik bitkilerde bulunmadığında çoğu zaman “diğer” koduyla ithalat ve ihracatları gerçekleştirilmektedir (Başer, 1998). Bu durumun en büyük sebebi tıp alanında ve aromatik yağ çıkarma amaçlı kullanılan bitki sayısının yüksek olması ve dolayısıyla onlardan elde edilen kimyasalların çok fazla çeşitliliğe sahip olmasıdır. Yine de bu konuda bir bilgi bankası UN Comtrade (Cenevre Uluslararası Ticaret Merkezi)’de bulunan dökümanlardan elde edilebilmektedir.

Tıbbi amaçlarla kullanılan bu bitkilerin bitkisel drog olarak en çok ticaretinin yapıldığı ülkeler Çin, Almanya, ABD, Fransa, İtalya, Japonya, İspanya, İngiltere ve Hong Kong’dur (Faydaoğlu & Sürücüoğlu, 2011).

### **2.1.3. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanım Alanları**

Tıbbi ve aromatik bilgiler gıda, kozmetik, ilaç sanayi ve tıp alanında kullanılmaktadırlar. Gıda alanında en yaygın kullanım baharat olarak tüketilmeleridir. Ülkemizin geçmişte de baharat yolu üzerinde olması, kullanım alanını yaygınlaştırmıştır. Baharatların bir diğer özelliği ise koruyucu, tatlandırıcı ve renklendirici madde olarak kullanılmasıdır; geleneksel ürünlerimizden sucuk ve pastırmada da bu özelliklerden faydalanılmaktadır. Bunların dışında, Türk Gıda Kodeksi Takviye Edici Gıdalar Tebliği’ndeki (Tebliğ No:2013/49) tanıma göre, beslenmeye ek olarak kullanılan tüm besin maddelerinin veya organizmada fizyolojik etkilere sahip olabilecek biyoaktif, hayvansal veya bitkisel maddelerini özütlerinin tek başına veya kompleks biçimde çeşitli formlarda sıvı veya toz olarak alınan ürünlerdir. Tıbbi ve aromatik ürünlerin gıda takviyesi olarak da kullanıldığı görülmektedir.

Kozmetik sektöründe parfüm, cilt bakım ürünleri, kişisel temizlik malzemeleri vb ürünlerde hem güzel koku hem de cilde faydalı özellikleri sebebiyle kullanılmaktadırlar. Son yıllardaysa bu kullanım artan bir eğilim göstermektedir. Nemlendirici, yatıştırıcı, onarıcı ve yenileyici olarak ülkemizde yaygın olarak kullanılanlar; Aynısefa (*Calendula officinalis*), Karakafesotu (*Symphytum officinale*), Kuşotu (*Stellaria media*), Papatya (*Matricaria recutita*- *Anthemis nobilis*), Bozot (*Marrubium vulgare*), Mürver (*Sambucus nigra*), Hayıt (*Vitex agnus-castus*); yaşlandırma karşıtı olarak Deniz iğdesi- Yalancı iğde (*Hippophae rhamnoides*), Ölmez çiçek (*Helichrysum sp.*), Ezan çiçeği (*Oenothera biennis*) ve saç bakımında kullanılanlarsa Huş ağacı (*Betula pendula*) ve Yara otudur

(*Prunella vulgaris*) (Tanrıkulu, 2014).

En önemli kullanım alanlarından biri ise tıbbi alanda tedavi amaçlı kullanımudur. Bunlardan bazıları çay şeklinde, demleme, kaynatma veya oda ısısında hazırlama, hazırlanarak tüketilir. Bir diğer hazırlama yöntemi ise ilaç şeklindedir; bitki suları, ekstre lapa, merhem, tıbbi yağ ve tentür ana hazırlama şekilleridir (Göktaş & Gıdık 2019).

Son yıllarda kullanım alanı olarak kendine yer bulan biyoyakıt kullanımı ise doğal ürünlere yönelimle kendine yer edinmeye başlamıştır. Fosil kaynaklı yakıtların bilinçsiz tüketimi sonucu oluşan kirlilik ve doğal hayatın bozulması gibi faktörler de bu ürünlerin kullanım alanlarının artmasının önünü açmıştır. Alternatif enerji kaynağı olarak kullanılmaya başlanan bu bitkilerden bir kısmı ayçiçeği, kolza, keten, jojoba gibi yağı çıkarıldıktan sonra posası kalan bitkilerdir ve ülkemizde ve dünyada günlük hayatta kullanımlarının artması için bilimsel çalışmalar devam etmektedir (Aytaç & Yiğen 2016, Göktaş & Gıdık 2019).

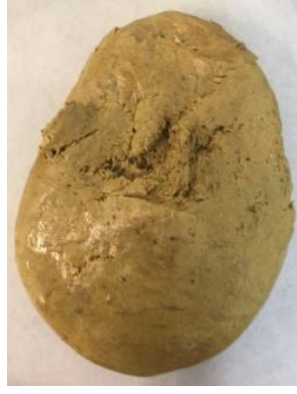
## 2.2. PROPOLİS

### 2.2.1. Propolisin Tarihçesi ve Tanımı

Propolis kelimesinin kökeni Antik Yunan'a dayanmaktadır; "pro" giriş, önünde anlamına gelirken, "polis" kelimesi ise şehir anlamına gelip, kelime anlamı olarak şehri koruyan anlamına gelmektedir (Castaldo & Capasso 2002, Bogdanov & Bankova 2012). *Apis mellifera L.* olarak bilinen bal arıları tarafından üretilirler ve hammadde kaynağı olarak çeşitli ağaçların yaprak, kök, gövde, tomurcuklarından topladıkları çeşitli yağlar, reçineler ve bitki özlerini kendi öz salgılarıyla birleştirerek, kuvvetli bir antifungal, antiviral ve antimikrobiyal özelliğe sahip bir karışıma dönüştürürler (Ghisalberti, 1979). Kovanı koruma ve onarma amaçlı olarak bu reçinemsî karışımı kullanırlar.



Şekil 2.1. Çeşitli propolis resimleri.



Şekil 2.2. Çeşitli propolis resimleri.

Propolis tarih olarak çok eskilere dayanmaktadır ve neredeyse her kültürde kendine ilaç olarak kullanım alanı bulmuştur. Bunun dışında M.Ö. 300 yıllarına dayanan tarihiyle günümüze kadar geleneksel ve bireysel kullanımlarda halen kendine yer bulmaktadır (Ghisalberti, 1979). İnsanlar dışında hayvan sağlığı üzerinde de kullanımları vardır. Antik Mısır'da mumyalama işlemlerinde çürüme önleyici olarak kullanılmıştır (Crane, 1979). Antik Yunan'da keşfi Aristo'nun arı kovanı incelerken mumsu maddeyi keşfetmesiyle başlamıştır. Yine Antik Yunan'da bazı aromatik bitkilerle karıştırılarak parfüm olarak kullanılmasının yanı sıra, dönemin hekimleri tarafından, Aristo, Hipokrat, Dioscorides (modern farmakopenin atası), medikal preparat ve uygulamalarda kullanılmıştır (Bogdanov & Bankova 2012, Kuropatnicki vd. 2013). Ayrıca savaş yaraları için askerlerin yanlarında taşıdığı ve egzema ve romatizmal hastalıklar için kullanıldığı bilinmektedir (Castaldo & Capasso 2002, Kuropatnicki vd. 2013, Salatino vd. 2005).

Antik dünyada hasat metodları bilinmemekle birlikte, bazı kaynaklarda söğüt, karaağaç, kavak gibi bazı ağaçların tomurcuklarından elde edildiği anılmaktadır (Bogdanov & Bankova 2012, Crane 1979). Günümüzde olduğu gibi o dönemde de maddi değerinin bala göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Crane 1979, Kuropatnicki vd. 2013).

Günümüze yaklaştıkça modern standardizasyonu sağlanmaya başlanmıştır. Bir farmakopede yayınlanması 17. yüzyıla dayanmaktadır, Londra farmakopesinde iltihap ve yaraların tedavisinde kara kavak ağacı kaynaklı propolisi yayınlamıştır ve ardından Avrupa'da kullanımı ve antimikrobiyal özelliklerinden faydalanımı artmıştır (Castaldo & Capasso 2002, Bogdanov & Bankova 2012). Sonrasında ilk patent 20. yüzyılın henüz başında ilk patentin alınmasıyla başlamış ve 1908 yılındaysa bilimsel literatüre girmesiyle hız kazanmış ve çalışmalar günümüzde yeni branşları da kapsayıp büyüyerek devam etmektedir (Pereira vd. 2002, Toreti vd. 2013).

## 2.2.2. Propolisin Bileşimi ve Kaynakları

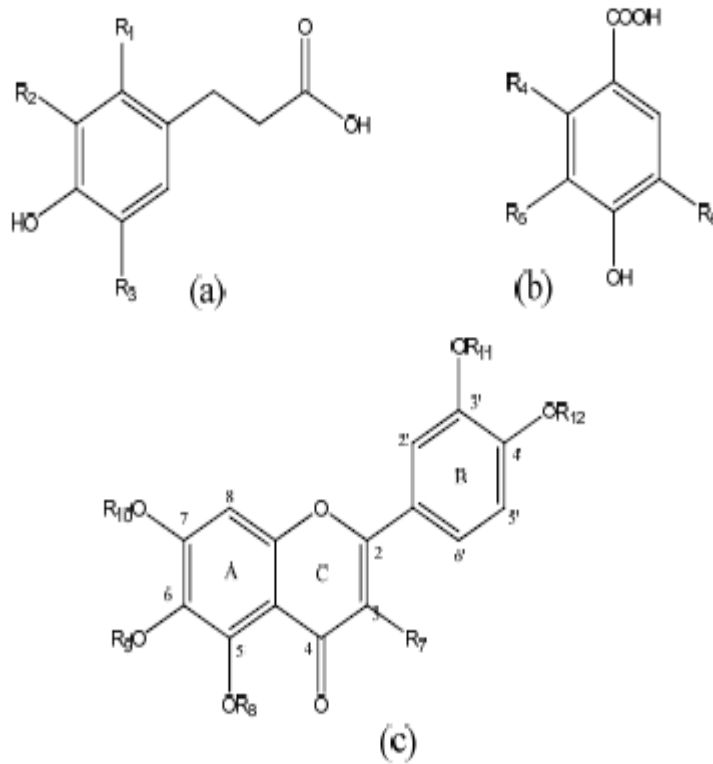
Propolis bal arılarının meşe, çam, köknar, kestane, karaağaç, söğüt gibi ağaçların gövde yaprak, sürgün ve tomurcuklarından topladıkları reçine ve çeşitli maddeleri kendi salgılarıyla karıştırmaları sonucu meydana gelir ve kovanın çeşitli bölgelerinde biriktirmeleri veya kullanmalarıyla depolanır (Ghisalberti 1979, Burdock 1998, Marcucci 1995).

Propolisin renk skalası sarı-yeşil-kahverengi arasında değişir. Ayrıca reçine oranına bağlı olarak kıvamı yoğun olabilir veya daha tozumsu bir yapıya sahip olabilir (Salatino vd., 2005). Ham propolisin kimyasal içeriği aşağıdaki gibidir (Bogdanov & Bankova 2012; Marcucci 1995, Bankova vd., 2000, Farré vd. 2004, Negri vd. 1998);

Çizelge 2.1. Ham propolisin kimyasal bileşimi.

Bileşim	Maddeler
<b><i>Balsam (Etanolde çözünebilen)</i></b>	
Reçine (%40-60)	Ketonlar, fenolik asitler, alifatik esterler flavonoidler, aldehitler esterleri, alkoller, alifatik asitler ve lignanlar.
Esansiyel Yağlar (%3-5)	Aromatik bileşikler, mono ve seskiterpenler.
<b><i>Balsam Olmayan</i></b>	
Bal Mumu (%20-35)	Balmumu ve bitkisel kökenli balmumu (monoesterler ve hidrokarbonlar) içerir.
Polen (%5)	Proteinler, amino asitler (esas olarak arginin ve prolin).
Diğer Bileşikler (%5)	Mineraller, vitaminler, şekerler, laktonlar, kinonlar, benzoik asit ve esterler, steroidler.

Propolis 300'den fazla bileşik içerir ve bunların başlıcaları flavanoidler, fenolik bileşikler (flavon, flavonol, flavonon, dihidraflavonol, isoflavonid ve kalkonlar) ve fenolik asitlerdir (Marcucci 1995, Bankova vd. 2000). Propoliste en yaygın bulunan fenolik bileşiklere ait kimyasal şekiller aşağıda verilmiştir;



Şekil 2.3. Propoliste en yaygın fenolik bileşikler. (a) Sınnamik asit, (b) benzoik asit, (c) flavonoidler.

Propolisın içeriğinin belirlenmesi ve standardize edilmesi aşamasında en büyük engel propolisın içeriğinin bölgesel olarak değişmesidir. Bu sebeple bazı kaynaklarda içeriğinin tam olarak bilinmemesi sebebiyle tıpta kullanılmasının uygun olmayacağı fikirleri öne sürülmüştür (Ghisalberti, 1979). Bitki örtülerinin bölgesel olarak değişimi bu tezi güçlendirmektedir. Ancak ham propolis belirli standartlarda üretilip ardından saflaştırılarak pazara sunulursa bu sorunların önüne geçmek mümkün olabilir (Banskota vd., 2001).

Toplanan ham haldeki propolisleri saflaştırmak içinse çeşitli ekstraksiyon yöntemleri kullanılabilir; en yaygın olan yüksek çözünürlüğe sahip olan organik çözeltilerden

etanoldür. Analiz için cihaz hassasiyeti açısından %99'luk, tıbbi amaçlardaysa genellikle %70'lik etanol kullanılmaktadır (Pietta vd., 2002). Ekstrakt eldesinden sonra içerik tanımlaması için en sık kullanılan yöntemler HPLC ve GC-MS gibi analiz cihazlarıdır. Kalitatif karakterizasyonun yapılması, içerik standardizasyonunda önemli adımlardandır. Bunların dışında ayrıca UV spektrofometrede flavanoid ve fenolik madde tayinlerinde sıklıkla kullanılmakta, zaman ve işçilikten tasarruf sağlamaktadır.

Farklı kökenlere sahip propolislerin antibakteriyel, antifungal veya antiviral vb gibi biyolojik aktiviteleri de farklılık göstermektedir; örneğin Türkiye propolisinde genellikle rejenerasyon, yara iyileştirme, antibakteriyel ve anti fungal özellikler öne çıkarken Brezilya propolisinde serbest radikaller ve antibakteriyel özellikler ön plandadır (Silici, 2003). Dünyada bölgelere göre yaygın propolis kaynakları, kimyasal bileşimleri ve orijinleri aşağıda verilmiştir (Salatino vd. 2005, Bankova vd. 2000, Kumazawa vd. 2003, Kumazawa vd. 2008, Popova vd. 2011, Chen vd. 2003, Popravko 1978, Dausch vd. 2008, Campo vd. 2008, Lotti vd. 2010, Castro vd. 2011 Cuesta vd. 2002)

Çizelge 2.2. Dünya genelindeki yaygın propolis kaynakları, orijinleri ve kimyasal özellikleri.

Coğrafi bölge	Propolis türü	Bitkisel kaynak	Temel bileşikler
Brezilya	Yeşil	<i>Baccharis spp.</i>	Diterpenler, kafeoilkuinik asitler, prenile fenilpropanoidler
Ilıman bölgeler (Avrupa, Kuzey Amerika, Asya'nın tropik olmayan bölgeleri, Yeni Zelanda)	Kavak	<i>Populus spp.</i>	Flavonlar, flavanonlar, sinamik asitler ve esterleri
Okinawa, Tayvan, Endonezya	Pasifik	<i>Macaranga tanarius</i>	C-prenil-flavanonları
Malta, Sicilya,	Akdeniz	Servigiller	Diterpenler

Çizelge 2.2. (devam) Dünya genelindeki yaygın propolis kaynakları, orijinleri ve kimyasal özellikleri.

Yunanistan			
Rusya	Huş Ağacı	<i>Betula verrucosa</i>	Flavonlar ve flavonoller (kavaktan farklı türde)
Meksika, Küba, Brezilya	Kırmızı	<i>Dalbergia spp.</i>	İzoflavonoidler, neoflavonoidler, pterokarpanlar, lignanlar
Brezilya, Venezuela, Küba	Clusia	<i>Clusia spp.</i>	Poliprenillenmiş benzofenonlar

Türkiye’deyse 2001’de yapılan bir çalışmaya göre belirli bölgelerin farklı üretim yerlerinden alınan propolisler kimyasal bileşimlerine göre aşağıdaki gibi tanımlanmışlardır (Sorkun vd., 2001);

Çizelge 2.3. Türkiye’deki bazı bölgelere ait propolislerin kimyasal özellikleri.

Bölge	Bursa			Erzurum	Gümüşhane	Trabzon
	(I)	(II)	(III)	(%)	(%)	(%)
Bileşik	(%)	(%)	(%)			
Alkoller	4.40	1.71	6.34	21.73	11.30	15.03
Alifatik Asitler	2.75	2.22	6.41	1.96	0.98	3.1
Aminoasitler	Çok	Çok d	Çok	4.46	-	-

Çizelge 2.3. (devam) Türkiye’deki bazı bölgelere ait propolislerin kimyasal özellikleri.

	düşük	düşük	düşük			
Aromatik asit esterleri	Çok düşük	13.14	3.10	31.86	5.52	5.12
Aromatik asitler	7.54	1.52	18.15	1.32	2.18	3.35
Aromatik aldehytler	3.91	-	1.86	2.24	1.05	0.95
Flavonoidler	47.40	31.8	37.55	4.72	50.55	43.55
Ketonlar	11.20	24.74	6.95	8.19	11.11	21.30
Diğer	20.88	20.87	10.09	20.21	13.31	7.87
Terpenoidler	1.92	4.50	7.70	3.31	Çok düşük	Çok düşük
A vitamini	-	-	1.84			

Bunlara ek olarak Düzce Bölgesi için yapılmış olan bir içerik tanımlamasında, Yığılca Yöresi propolisinin %70’lik etanolik ekstraktının içeriği aşağıdaki gibi tanımlanmıştır (Rasgele vd., 2018).

Çizelge 2.4. Yığılca Yöresi propolisinin %70’lik etanolik ekstrakt içeriği.

	Bileşik	Min. (µg/ml)	Maks. (µg/ml)	Ortalama	
		İstatistik	İstatistik	İstatistik	Standart hata
Fenolik asitler	3-4 Dimetoksisinnamik asit	47.00	8440.00	1316.55	901.46
	Protokateşuik asit	971.00	1601.00	1350.40	117.54

Çizelge 2.4. (devam) Yığılca Yöresi propolisinin %70'lik etanolik ekstrakt içeriği.

	Transsinnamik asit	15.00	1149.00	398.37	163.49
	Kumarik asit	7.00	772.00	310.66	133.28
	Ferulik asit	20.00	842.00	209.16	128.10
	Rosmarinik asit	103.00	608.00	358.00	75.33
	Transferulik asit	454.00	473.00	465.33	5.78
	Gallik asit	9.00	40000.00	8636.88	4710.73
Flavanooidler	Biochanin	3937.00	74352.00	28001.33	23181.01
	CAPE	44.00	50405.00	6122.55	5543.08
	Katehin	283.00	4000.00	1190.14	558.57
	Hesperidin	48.00	926.00	289.60	161.13
	Kaempferol	250.00	277.00	263.50	13.50
	Pinobankstin	2701.00	3836.00	3182.33	338.78
	Pinostrobin	761.00	11903.00	3766.11	1265.40
	Apigenin	40.00	1400.00	351.00	185.04
	Naringenin	56.00	524.00	182.55	51.33

Düzce Bölgesi Yığılca Yöresi propolisinde tabloda belirtildiği üzere; en yüksek oranda gallik asit, biochanin, CAPE (kafeik asit fenil ester) ve pinostrobin bulunmaktadır. Gallik asitin başlıca özellikleri antioksidan aktivite, antidepresan ve antikanser özellikleridir. Biochanin antitümör özelliğiyle ön plana çıkmaktadır. CAPE ise yine antioksidan, antikanser ve antiviral özellikleriyle ön plana çıkmaktadır (Borrelli vd., 2022). Son olarak pinostrobin antibakteriyel etkiye sahiptir (Rasgele vd., 2018).

Propolisin içerik farklılığının bölgesel olması gibi, hasat zamanının da bölgesel olarak

verimli olduğu durumlar söz konusudur. Örneğin sıcak iklimlerde ağaçlar nektar verdikten sonra propolis içeriği bölgedeki arıların bu nektarı kullanmasıyla zenginleŖeceđinden, hasadın bu dönemden sonraya bırakılması tavsiye edilir (Donadieu, 1979).

### **2.2.3. Propolisin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri ve Bunları Etkileyen Faktörler**

Propolisin kimyasal bileŖimi, hasat edildiği bölgenin bitki örtüsüne ve dolayısıyla coğrafik koŖullarına bağlı olarak deđiŖmektedir. Üretimi esnasında arılar tarafından kimyasal bir deđiŖime uğratılmadığından, daha çok nektar olarak sınıflandırılmaktadır. Kimyasal içeriği zaman zaman toplandığı bitkiden farklı gibi görünse de bu durum genellikle sıcaklık ve buharlaŖma gibi fiziksel bir etmenden kaynaklanır (Bankova vd. 2000, Simone vd. 2010).

Propolis yaklaŖık %50 reçine ve fenolik bileŖikler, %30 mumsu yapı, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen ve %5'i aminoasitler, vitaminler, mineral tuzlardır (Burdock, 1998).

İçeriğindeki yüksek reçine fiziksel özelliklerine de etki ederek yapışkan bir madde olmasını sağlar. Ayrıca toplandığı bölgesi hasat zamanı, depolanma süresi ve koŖulları (sıcaklık, nem, zaman) gibi etmenler renginin açık sarıdan yeŖile ve koyu kahverengine kadar uzanan bir renk skalasına sahip olmasına yol açar. Ayrıca yine reçine ve mumsu madde içeriği dolayısıyla yüksek sıcaklıkta yumuŖak ve yapışkan, düşük sıcaklıklardaysa sert ve kırılğan bir yapıya sahiptir (Silici, 2003). 15°C ve daha düşük sıcaklıklarda kısmen veya tamamen donmuŖ duruma geçer. 25-45°C arasında yapışkan ve esnek yapıdadır. Genellikle 60-70°C'lerde sıvı durumuna geçer ama bazı türlerinde erime noktası 100°C'yi bulmaktadır (Krell, 1996).

Farklı bölgelere ait propolisler incelendiğinde yaklaŖık 300 farklı eŖit kimyasal bileŖik saptanmıŖtır (Bankova vd., 2000). Propoliste bulunan ana kimyasal grup ve en biyoaktif bileŖikler fenolik asit ve flavonoidleri de içeren fenolik gruplardır (Marcucci 1995, Bankova vd. 2000).

Uçucu ve aromatik yağlar da propolisin kimyasal yapısında düşük oranlarda da olsa bulunurlar. Miktar olarak oldukça düşük olan bu bileŖikler aromatik, biyolojik ve karakterizasyon açısından oldukça büyük öneme sahiptirler (Bankova vd., 2000).

#### 2.2.4. Propolisin Biyolojik ve Farmasötik Özellikleri ve Bu Alanlarda Kullanımı

Propolisin antimikrobiyal, antifungal, antitümör, anti-HIV, antitüberküloz, antiviral ve antioksidan aktivitesi gibi biyolojik özelliklere sahip bir kaynaktır (Burdock 1998, Banskota vd. 2001, Gekker vd. 2005, Yildirim vd. 2004). Ayrıca son yıllarda yapılan araştırmalar farmasötik özelliklere de sahip olduğunu göstermektedir. Fenolik bileşikler bu etkilerden sorumludur (Seruga vd., 2011). Her ne kadar propolis bölgesel olarak içerik değişikliğine uğrasa da bu özellikler genel olarak her propoliste bulunmaktadır (Crane 1979, Bankova, 2005). Bunların yanında medikal etkilere sahip özellikleri de barındırmaktadır. Aşağıdaki tabloda farklı propolis kaynaklarına ait bileşikler ve bunların biyolojik aktiviteleri verilmiştir (Ghisalberti 1979, Pietta vd. 2002, Popova vd. 2011, Bankova 2009, Banskota vd. 2001, De Almeida vd. 2001, Farooqui, & Farooqui 2010, Aga vd. 1994, Basnet vd. 1996, de Albuquerque vd. 2008).

Çizelge 2.5. Farklı propolis kaynaklarına ait bileşikler ve bunların biyolojik aktiviteleri.

Propolis türü	Bileşik	Biyolojik aktivite
Tüm propolis türleri	Polifenoller, flavanoidler	Antibakteriyel, antiviral, antifungal, antioksidan, antitümör, antialerjik, antienflamatuvar, antiülser, antiosterporotik, antiateroskleroz, kardiyoprotektif, antitrombojenik immünomodülatör, antiaging
Brezilya	Esansiyel yağlar	Antibakteriyel
Yeşil	Artepillin C	Antioksidan, antienflamatuvar, antitümör
	Dikaffeoyikininik asit	Hepatoprotektif
Kavak	CAPE ve diğer kafeatlar	Antibakteriyel, antiviral, antioksidan, antitümör, anti osteoporoz, fungusit, immünomodülatör, kardiyoprotektif, hepatoprotektif

Çizelge 2.5. (devam) Farklı propolis kaynaklarına ait bileşikler ve bunların biyolojik aktiviteleri.

Kavak, yeşil	Kafeik asit	Antiviral, antioksidan, antitümör, antiülser
Yunanistan	Diterpenler	Antibakteriyel, antifungal
Clusia	Poliprenilatid benzofenonlar	Antioksidan, antienflamatuvar, antitümör
Clusia	Poliprenilatid benzofenonlar	Antioksidan, antienflamatuvar, antitümör

Propolisin en sık faydalanılan özellikleri antimikrobiyal, antifungal ve antiviral özellikleridir.

Bakterisidal etki gösterdiği mikroorganizmalar; *Bacillus* larvaları, *B. subtilis* ve diğerleri, *Staphylococcus* türleri, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* ve *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae*'dir (Ghisalberti 1979, Mereste & Mereste 1988, Cherniak 1973, Dimov vd. 1991, Rojas vd. 1990, Simuth vd. 1986, Petri vd. 1988, Okonenko 1988). Gram (+) bakterilere karşı daha etkilidir (Mirzoeva vd., 1997). Türkiye propolisinde yapılan bir araştırmada en etkili olduğu suşlar *Salmonella typhimurium* ve *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Enterobacter aerogenes*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *Streptococcus sobrinus* ve *Enterococcus faecalis*'tir (Uzel vd., 2005).

Fungisidal etki gösterdiği mikroorganizmalar; *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Ascospaera apis*, *Plasmopara viticola*'dır (Petri vd. 1988, La Torre vd. 1990, Hofmann vd. 1989).

Antiviral etki gösterdiği mikroorganizmalar; Herpes, Patates virüsü ve Influenza'dır (Popescu vd. 1985, Fahmy vd. 1989, Serkedjieva vd. 1992).

Propolisin en sık kullanıldığı alanlardan apiterapi merkezleri dolayısıyla kozmetik sanayisidir. Apiteratipide kullanımı da ülkemizde 2014 yılından itibaren Sağlık Bakanlığı

tarafından kabul görmüştür (Karahancı vd., 2015). Bunun dışında ilaç sektöründe de giderek artan kullanım alanıyla kendine yer bulurken gıda sektöründe henüz çok yenidir. Kozmetik sanayinde antiaging (yaşlanma karşıtı), hücre yenileme ve onarma özellikleriyle öne çıkmaktadır. Ayrıca geçmişten beri kullanım alanı olan antifungal özellikleri sayesinde mantar için uygulanan kozmetiklerde antibakteriyel özellikleri dolayısıyla da bakterisit kozmetiklerde kullanımı yaygındır (Lejeune vd., 1988).

Propolisle birlikte zenginleştirilen E vitamini, arı sütü gibi ürünlerin katkıları ve çeşitli ilavelerle oluşturulan bakım kremleri, şampuan, losyon, temizleme sütleri, yüz maskesi, burun spreyleri, diş macunu ve hatta sabunlarda da kullanımı kozmetik sektörüne geniş bir yelpazeye sahip olduğunu göstermektedir (Erdem, 2002).

İlaç sanayinde kullanımında hücre yenileyici özelliğiyle kardiyovasküler ve kan dolaşım sistemi hastalıkları, diş sağlığı, doku-ülser tedavileri, yanık tedavilerinde kullanılmaktadır. Antienflamatuvar özelliği sayesinde solunum sistemi hastalıkları, mukozal zar enfeksiyonları ve lezyonları tedavilerinde; antikanser özelliği sebebiyle kanser tedavilerinde kullanılmaktadır (Krell, 1996). İlaç sanayiinde kısıtlı olarak kullanımının olmasının başlıca sebebi ürünün standardize edilememesi sebebiyle patent alma probleminin oluşması ve bunun yanında sentetik ürün kullanımının ilaç sektöründeki yaygınlığıdır. Ancak son yıllarda sentetik ürün hassasiyetinin doğurduğu tıbbi ve maddi yükler doğal kaynaklara yönelimi arttırmıştır. Örneğin Avrupa ve Amerika'da arı ürünleri kapsül, tablet, granül ve pastil gibi oral dozlarla satışa sunulmuştur. Fareler üzerinde yapılan deneylerde diş çürüğünün önlenmesinde ve başlangıç düzeyindeki çürüklerde geri döndürücü etkisi olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca sentetik antibiyotiklerin tersine direnç oluşturmazken yararlı bakterilere de zarar vermemesi sebebiyle nadir bulunan geniş spektrumlu antibiyotik sınıfında kabul görmektedir (Erdem, 2002). Antifungal özellikleri sebebiyle çeşitli mantar enfeksiyonlarında kullanılabileceği gözlemlenmiştir (Siqueira vd., 2015). Bu çalışmalara ek olarak yapılan araştırmalarda deri ve yüzey rahatsızlıkları; sedef, mide ülseri, deri ülseri, aftlar, diş tedavileri, uçuklar ve ikinci derece yanıkların yanı sıra Beriberi, çeşitli böbrek hastalıkları, diyabet, kemik erimesi, bazı iyi huylu tümörler, bronşit ve nefes darlığı gibi hastalıkların tedavilerinde de kullanılabileceği, geniş bir skalaya sahip olduğu bildirilmiştir (Kumova, 2002).

Kullanım alanı en az olan ve gelişmekte olan bir diğer sektör gıdadaysa en sık kullanım

özelliği antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesidir. Raf ömrü gıdaların ulaşılabilirliğini sağlamak ve kullanım sürelerini arttırabilmek açısından oldukça büyük öneme sahiptir. Belirli bölgelerde kısıtlı üretimi olan gıdaların diğer bölgelerde de tüketimini sağlayabilmek, hızlı bozulan değerli ürünlerin kullanılabilirliğini attırabilmek açısından bu konuda gerek ambalaj gerekse katkı maddelerinden yararlanılmaktadır. Tıpkı farmasötik alanda olduğu gibi gıda sektöründe de doğala dönüş yaşanmasıyla yapay koruyuculardan kaçınılmaya başlanmış ve doğal olana dönüş başlamıştır. Donmuş balıkların dondurulma proseslerinde, peynir üretimlerinden sonra peynirlerin dış yüzeylerine düşük konsantrasyonlarda uygulanması, fermente et ürünlerine düşük oranlarda katılmasıyla raf ömründe uzama sağlamaktadır (Donadieu 1979, Aly vd. 2007, Ali vd. 2010). Ancak bu olumlu etkilerinin yanında belirli konsantrasyonların üzerinde kullanımı ürünlerdeki toksik etkiyi de arttırabilmektedir (Aly vd., 2007). Ayrıca son yıllarda artan bir ilgi gören fonksiyonel ve katkılı gıda furyası da gıda sektöründe kullanım alanını arttırmasında olumlu etkide bulunmuştur. Katkılı gıda yalnızca insanlar için değil, hayvan yemlerinde de etkisini göstermektedir. Bazı kümes hayvanlarının yemlerine propolis katkısı yapılması sonucu yem verimliliğini arttırmasının yanı sıra kütle artışına da olumlu katkı sağlamaktadır (Battaa vd. 2016, Abdel vd. 2013). Gıda ürünlerinin çabuk bozulmasının başlıca sebebi çabuk okside olmaları ve mikroorganizma üremesidir. Yüksek antioksidan içeriğine sahip olan propolis gıdalarda oksidatif bozulmanın önüne geçmektedir; salam, sosis ve tereyağı gibi ürünlerde oksidatif bozunmayı engellerken, lipid oksidasyonunu da azaltmaktadır ancak bir yandan da duyuşal testlerde daha düşük sonuçlara sebep olabilmektedir (Katalinic vd. 2004, Bernardi vd. 2013). Yapay antioksidanlara göreirse daha yüksek antioksidan etkiye sahiptir (Kunrath vd., 2017). Antibakteriyel etkisi sebebiyle et ve süt ürünlerinde de kullanılabilir. Özellikle et ürünlerinde kimyasal koruyucu görevi görmektedir (Han vd., 1995). Süt ürünlerindeyse oldukça geniş bir yelpazede görev yapmaktadır. Fermente süt ürünlerinde yararlı bakterilerin gelişimine olumlu katkı sağlarken, zararlı bakterilerin gelişimi durdurmakta veya azaltmaktadır (Gao Vd., 2011). Meyve suyu üretiminde sık karşılaşılan sorunlardan olan küf üremesine karşı kullanıldığında, propolisin sodyum benzoata göre tüm küf türlerinde daha yüksek antifungal etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Koc vd., 2007). Tek başına koruyucu olarak kullanılmasının yanı sıra yapay koruyucularla kombine şekilde kullanılarak bakteri gelişimleri engellenebilmektedir (Yang vd., 2017).

### **2.2.5. Propolisin Çeşitli Ekstraksiyon Yöntemleri ve Bunların Etkileri**

Propolisin kullanılabilmesi ve analiz edilebilmesi için ham propolisin ekstraksiyonunun yapılması gerekmektedir. Bunun için birçok metot bulunmaktadır; başlıca kullanılanlarsa organik çözücülerde uygulanan ekstraksiyon metodlarıdır. En yaygın kullanımı etanolik ekstraksiyonlardır; tıbbi amaçlı kullanımlarda %70'lik etanol kullanılırken, kimyasal analiz için genellikle %96'lık alkol kullanımı yaygındır. Ancak hamilelerde tüketim ve helal kavramı göz önünde bulundurulduğunda son yıllarda sulu ekstraktlarla ilgili çalışmalar da artmıştır ancak yeterli miktarda bileşeni çözemediği için tercih edilmemektedir (Gomez vd., 2006). Bu iki çözücü dışında metanol, kloroform, propilen glikol, etil asetat, metilen klorür, diklorometan, aseton, hegzan ve siklodekstrin de diğer çözücülerdir (Bakkaloğlu, & Arıcı, 2019). Çözücünün türü, ekstraksiyon sıcaklığı ve süresi, ekstraksiyon öncesi katın fazın hazırlanması, katı fazın miktarı, difüzyon hızı ve ham propolisin nemi ekstraksiyon hızına etki eden faktörlerdir (Meireles, 2008).

Propolis içindeki tıbbi bileşenleri içeren balsamı ekstre edebilmek için en sık kullanılan yöntem %70'lik etanol çözeltisi kullanmaktır (Gomez vd., 2006). Yüksek balsam, düşük reçine ve yüksek aktivite demektir (Seruga vd., 2011). Bu çözücü konsantrasyonu ile uygulanan oldukça fazla metot vardır; genel hatlarıyla metotlar propolisin belirli bir süre çözücüde bekletilmesi, süzülmesi, miktar tayininin yapılması ve analize alınması şeklindedir. Hatta bu adımlar tüm çözücülerde birbirine benzemektedir. Klasik teknikler, çözücülerini karıştırma ve / veya ısıtma ile kullanımına dayanmaktadır. En yaygın kullanılan teknikler arasında, soxhlet ekstraksiyonu, maserasyon, ultrasonik ekstraksiyon, mikrodalga ekstraksiyonu ve süper kritik sıvıların kullanımı bulunmaktadır (Wang vd., 2006). Etanolik ekstraksiyonun uygun olmadığı uygulamalarda alternatif metotlar tercih edilmektedir.

## **2.3. İLAÇ**

### **2.3.1. İlacın Tanımı ve Genel Özellikleri**

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre ilaç "fizyolojik sistemleri veya patolojik durumları insanın yararı için değiştirmek veya incelemek amacı ile kullanılan ve kullanılması öngörülen herhangi bir madde veya üründür.". Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi'ne göreyse ilaç şu şekilde tanımlanır "Resmi bir farmakope veya formüller tarafından tanınan bir madde. Hastalığın teşhisinde, iyileştirilmesinde, hafifletilmesinde, tedavisinde veya

önlenmesinde kullanılması amaçlanan bir madde. Vücudun yapısını veya herhangi bir işlevini etkilemesi amaçlanan bir madde (gıda dışında).”.

İlaçların fayda sağlayabilmesi adına kullanım miktarlarında sınırlamalar bulunur ve bu genel adıyla doz olarak isimlendirilir. Dozun farmakolojik tanımıysa tek seferde veya günde kullanılabilecek zararsız miktarı, tedavi dozu ise tedavi etkisi gösteren miktardır, en yüksek tedavi dozuyorsa maksimum doz olarak isimlendirilir (Cingi vd., 1996)

Absorpsiyon (emilim) ilacın belirli bir doku veya organ tarafından, vücuttaki çeşitli engelleri aşarak belirli bir derişim eşiğinde hedefe ulaşılarak vücut tarafından emilmesidir. Emilimin sonrasındaki aşamaysa ilacın kan yoluyla vücuttaki diğer bölgelere dağılımını oluşturur. Bir ilacın etkinliğini göstermesinde ilacın çözünürlüğü, membranlarda tutunması ve serbest kalması ön koşul olmasa da etki göstermektedirler (Cingi vd. 1996, Vermathen vd. 2000).

FDA'ya göre 5 farklı ilaç başvuru türü bulunmaktadır;

- Araştırma Amaçlı Yeni İlaç (IND); Mevcut Federal yasa, bir ilacın eyalet sınırları arasında taşınmadan veya dağıtılmadan önce onaylanmış bir pazarlama uygulamasına tabi olmasını gerektirir. Destekleyici muhtemelen araştırma ilacını birçok eyaletteki klinik araştırmacılara göndermek isteyeceğinden, bu yasal gereklilikten muafiyet talep etmelidir. IND, sponsorun FDA'dan bu muafiyeti teknik olarak elde ettiği bir araçtır,
- Yeni İlaç Başvurusu (NDA); Yeni bir ilacın sponsoru, FDA'nın pazarlama onayı gereksinimlerini karşılamak için ilacın güvenliği ve etkinliği hakkında yeterli kanıt elde edildiğine inandığında, sponsor FDA'ya yeni bir ilaç başvurusu (NDA) sunar. Başvuru, kimya, farmakoloji, tıp, biyofarmasötikler ve istatistikler dahil olmak üzere gözden geçirilmek üzere belirli teknik bakış açılarından veriler içermelidir. Gizlilik Sözleşmesi onaylanırsa, ürün Amerika Birleşik Devletleri'nde pazarlanabilir. Dahili izleme amacıyla, tüm Gizlilik Sözleşmelerine bir Gizlilik Sözleşmesi numarası atanır
- Kısaltılmış Yeni İlaç Başvurusu (ANDA); FDA'nın İlaç Değerlendirme ve Araştırma Merkezi, Jenerik İlaçlar Ofisine gönderildiğinde, jenerik bir ilaç ürününün incelenmesini ve nihai onayını sağlayan verileri içerir. Jenerik ilaç uygulamaları "kısaltılmış" olarak adlandırılır çünkü genellikle güvenlik ve etkililik oluşturmak için prelinik (hayvan) ve klinik (insan) verileri içermeleri

gerekmaz. Bunun yerine, jenerik bir başvuru sahibi, ürününün biyoeşdeğer olduğunu (yani yenilikçi ilaçla aynı şekilde performans gösterdiğini) bilimsel olarak kanıtlamalıdır. Onaylandıktan sonra, başvuru sahibi, Amerikan halkına güvenli, etkili ve düşük maliyetli bir alternatif sağlamak için jenerik ilaç ürününü üretebilir ve pazarlayabilir.

- Reçetesiz Satılan İlaçlar (OTC); Reçetesiz satılan (OTC) ilaçlar, Amerika'nın sağlık hizmetleri sisteminde giderek daha hayati bir rol oynamaktadır. OTC ilaç ürünleri, tüketicilere reçetesiz satılan ilaçlardır. Akne ilaç ürünlerinden kilo kontrolü ilaç ürünlerine kadar 80'den fazla OTC ilaç kategorisi vardır. Reçeteli ilaçlarda olduğu gibi, CDER, doğru şekilde etiketlenmelerini ve yararlarının risklerinden daha ağır basmasını sağlamak için OTC ilaçları denetler.
- Biyolojik Lisans Başvurusu (BLA); Biyolojik ürünler, Halk Sağlığı Hizmeti (PHS) Yasası hükümlerine göre pazarlama için onaylanmıştır. Yasa, eyaletler arası ticarete satış için biyolojik bir ürün üreten bir firmanın ürün için lisans sahibi olmasını şart koşuyor. Biyolojik lisans başvurusu, biyolojik ürünün üretim süreçleri, kimyası, farmakolojisi, klinik farmakolojisi ve tıbbi etkileri hakkında özel bilgiler içeren bir sunumdur. Sağlanan bilgiler FDA gerekliliklerini karşılıyorsa, başvuru onaylanır ve firmanın ürünü pazarlamasına izin veren bir lisans verilir.

İlaçların uygulanış biçimlerine göre ayrıldığı dozaj formları bulunmaktadır. Bunlardan başlıcaları; aerosol, kapsül, krem, emülsiyon, film tablet, tablet, solüsyon, süspansiyon, jel, saşe, enjektör, losyon, pastil, sprey ve şurupdur (Anonim., 2008).

ISO 11239 Dozaj Formu (DF) ve Uygulama Yolu (RoA), tıbbi ürünle ilgili farmasötik dozaj formlarını, sunum birimlerini ve uygulama yollarını benzersiz ve kesinlikle tanımlayan veri öğelerini ve yapısını belirtir (International Standard 2012). ISO 11239 ve ISO Teknik Spesifikasyonu (TS) 20440: 2016, örneğin, dozaj formu terminolojisinin aşağıdakileri içeren zorunlu uygunluk özelliklerine sahip olduğunu belirtir:

- 1) Maddenin hali (katı-sıvı-gaz-yarı katı vb)
- 2) Temel doz formu
- 3) Salınım özellikleri
- 4) Etki etmesi istenen bölge

5) Transformasyon ve

6) Uygulama yöntemi (Dosage form and route of administration 2019).

Uluslararası standartlara göre belirli tanımlamalar bulunmaktadır. Bunlardan biri uygulanabilir doz formudur. Uygulanabilir doz formu; üretilen doz formunun herhangi bir gerekli dönüşümü gerçekleştirildikten sonra hastaya uygulanacak farmasötik doz formudur; enjeksiyon için solüsyon, oral kullanım için tablet vb. gibi. Uygulama aparatıysa tıbbi ürünün doğru uygulanmasına yönelik ekipmandır; iğne, şırınga gibi ve bunlar genellikle ürün kutusunun içerisinde olur veya ürünler birlikte hastaya sunulur. Uygulama metoduysa ilacın oral, intranasal, sabuktan vb ilacın hastaya uygulanması gereken bölgeyi temsil eder. Temel doz formu ilgili farmasötik doz formunu temsil eder; tablet, süspansiyon, kapsül vb gibi. İlacın doğru şekilde kapatılarak saklanması amaçlayan birimeyse kap/kapak sistemi denir, çocuk kilitli kapak, kap, vida kabak gibi örnekler bu sınıfa girmektedir (International Standard 2012).

### **2.3.2. İlaç Etken Madde ve Eksipiyen Tanımı**

İlaçlar genel anlamda etken madde ve taşıyıcı (sıvağı) olarak iki ana kısımdan meydana gelmektedir. Etken madde canlı üzerinde fizyolojik etki gösteren madde veya birkaç maddenin birleşimi veya karışımıdır. Taşıyıcı ise eksipiyen olarak adlandırılan yardımcı maddelerden meydana gelmiş olan, canlı organizma üzerinde herhangi bir etkisi olmayan, etken maddenin daha kolay canlı yapıya alınmasını sağlayan yardımcı maddeler bütünüdür. İlaç ise bir veya birden fazla etken maddeye sahip, hastaya uygulanabilecek forma dönüştürülmüş tedavi edici son üründür (Cingi vd., 1996).

Yardımcı maddeler tıbbi ürünlerde üretimi, stabiliteyi, emilimi, uygulamayı ve bazı durumlarda ilaç hedeflemeyi kolaylaştıran temel bileşenlerdir. Aynı zamanda estetik görünümü geliştirebilir, ürün farklılaştırmasını kolaylaştırabilir ve uyumluluğu iyileştirebilirler (Moreton, 2010). Tarihsel olarak, koruyucular kozmetik ve gıda ürünlerinde yaygın olarak kullanılmıştır.

### **2.3.3. İlaç Koruyucu Maddelerin Tanımı**

İlaçların bozulmasını engellemek için kullanılan maddelerin geneline ilaç koruyucu maddeler denir. Bu maddeler mikrobiyal üremeyi veya istenmeyen kimyasal değişikliklerin önüne geçmek için kullanılırlar. Sentetik veya doğal olarak iki ana gruba ayrılırlar. Doğal koruyucular bitki, hayvan veya mineral gibi doğal kaynaklardan elde

edilirken, yapay koruyucular sentetik yollardan elde edilen kimyasallardır (Constantinides vd., 2004). Özellikle su içeriği yüksek ürünlere eklenen koruyucular depolama esnasında mikroorganizmaların ürün yapısını değiştirmesini ve bozmasını engellemeye yardımcı olur. İlaçlara eklenen koruyucu maddelerin büyük kısmı bakteri, maya ve küflerin üremesini engellemek içindir. Bunların üremesini tamamen durduramazlar ancak yavaşlatırlar. Bazı yardımcı maddelerin ilaç içeriğinde yüksek oranlarda olmasıysa koruyucu madde kullanımını gerekliliğini ortadan kaldırabilir, örneğin aşırı doymuş çözeltiler gibi (Uerpmann, 2017).

İdeal bir koruyucu tahriş edici ve toksik olmamalıdır, fiziksel ve kimyasal olarak stabil olmalıdır, etken ve yardımcı maddelerle geçimli olmalıdır, iyi bir mikrobiyal ajan olmalıdır ve bununla birlikte geniş bir etki spektrumuna sahip olmalıdır, düşük konsantrasyonlarda etkililiği olmalıdır ve ürünün imalatı, raf ömrü ve kullanımı süresince etkililiğini göstermelidir (Nielsen vd., 2011).

Çok sayıda kalite gereksinimi (potansiyel olarak çelişen gereksinimlerle birlikte), dozaj formu tasarımı öncesinde ve sırasında yapılandırılmış bir risk değerlendirme uygulamasının önemini zorunlu kılar. Steril olmayan farmasötik preparatlar için tipik mikrobiyolojik risk değerlendirmeleri tüm farmakopilere dahil edilmiştir (European Pharmacopoeia (Ph. Eur. 6.3 2009, Japanese Pharmacopoeia 2008).

API, ekspiyanlar, kap / kapama gibi girdi materyalleri ile potansiyel olarak ilişkili olası mikrobiyal yükü anlamaya ek olarak, koruyucu sistemi güçlendirebilecek veya inaktive edebilecek faktörlerin hesaba katılması da önemlidir. Örneğin, ürün stabilitesi, çözünürlük ve mikrobiyal etkinlik için optimum pH nadiren aynıdır (Quality Risk Management 2005). Örneğin, optimal olarak etkili olmayan ürün pH'larında bir koruyucu kullanmak ve etkili antimikrobiyal etkinlik için koruyucu konsantrasyonunu arttırmak gerekli olabilir. Potasyum sorbat, pKa'sında (4.7) optimal olarak etkilidir ve 6'nın üzerindeki pH'larda minimum antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu iddia edilmektedir ancak 6.0'ın üzerindeki pH değerlerinde etkili olabilir, ancak tipik olarak daha düşük pH'larda kullanılandan çok daha yüksek konsantrasyonlarda yani pH 4-5'te  $\leq 0.2$  w / v, ancak 6'dan büyük pH'larda  $\geq 0.5$  w / v (Sheskey vd., 2006).

Daha yaygın olarak kullanılan koruyucuların bazılarına ilişkin, özellikle de Avrupa'da, büyük ölçüde içsel güvenlik ve etiketleme hususlarının daha sınırlı bir değerlendirmesine dayanan olumsuz bir görüş vardır. Bu, özellikle paraben içeren pediatrik, çok dozlu oral

ürünler için sözde “rahatsız edici” koruyucuların yerini almak için uyumlu bir çabaya yol açmıştır (Excipient labelling 2007).

#### 2.3.4. İlaç Koruyucu Sınıflandırılması ve Etki Mekanizması

performans standartlarını karşılamak için koruyucu kombinasyonlarının kullanılması yaygın bir uygulamadır. Şu anda yaygın olarak kullanılan koruyucular, Kimyasal Sınıfları ile birlikte çizelge 2.12’de listelenmiştir. Kimyasal yapı, yalnızca etki şekillerini değil, aynı zamanda fiziko-kimyasal özellikleri ve bir üründeki diğer bileşenlerle etkileşim eğilimini de etkileyebilir. Bu tür olasılıkların dozaj formu tasarımında dikkate alınması gerekir.

Çizelge 2.6. Farmasötik ürünlerde en sık kullanılan koruyucular ve kullanılan formlara göre içerik yüzdeleri.

Koruyucu	Sınıf	İçerik oranı (%)			
		Oral sıvı	Parenteral	Optalmik/nazal	Krem
Metil paraben	Amino aril asit esterler	0.25	0.01-0.5	0.1	0.001-0.2
Etil paraben		0.1-0.25	0.01-0.5	0.1	0.001-0.2
Propil paraben		0.5-0.25	0.005-0.02	0.1	0.001-0.2
Butil paraben		0.1-0.4	0.015	0.1	0.001-0.2
Benzil alkol	Alkil/ aril alkol	3.0	0.5-10		
Klorobutanol		0.5	0.25-0.5	0.5	0.5
Fenol	Fenol	0.1-0.5	0.065-0.02		0.25-0.5
Metakresol		0.15-0.3	0.1-0.25		0.1-0.3
Kloro kresol		0.2	0.1-0.18		0.1-0.3
Benzoik asit	Alkil/aril asit	0.1-0.2			
Sorbik asit		0.1-0.2			
Tiomersal	Organik cıva	0.1	0.01	0.01	0.01

Çizelge 2.6. (devam) Farmasötik ürünlerde en sık kullanılan koruyucular ve kullanılan formlara göre içerik yüzdeleri.

Benzetonyum klorür		0.01-0.02	0.01	0.004-0.01	0.01
Fenilmerkürük nitrat		0.002-0.1	0.002	0.004	0.002
Bronopol	Diol	0.01-0.1			
Propilen glikol		15-30			
Benzalkonyum klorür	Dörtlü amonyum bileşikleri	0.002-0.02	0.01	0.004-0.02	0.01

Koruyucular genellikle viral organizmalara karşı sınırlı etkinlik gösterirler ancak bakteri, maya ve küflere karşı etki gösterirken hücre duvarı, membran veya sitoplazmayı hedef alır. Her koruyucu için kesin bir etki alanı belirlemek zor olsa da hedef koruyucunun konsantrasyonlarına bağlı olarak değiştirilebilir.

Antioksidanlar; oksijene duyarlı olduklarından oksidasyona bağlı olarak bozunmaya uğrayan etken maddelerin oksidasyonunu önleyen ajanlardır. E ve C vitaminleri, Butil hidroksianisol (BHA) ve Butillenmiş hidroksitoluen (BHT) buna örnek olarak verilebilirler. Antioksidan ajanlar, kendi kendini indirgeyen ajan olarak işlev görür ve oksijene duyarlı bileşenlerin oksidasyonunu önlerler. Antimikrobiyaller; farmasötik preparatın bozulmasına neden olan gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmaya karşı etkilidirler ve çok az miktarlarda dahi etki ederler, en sık kullanılanlar nitritler, benzoatlar ve sorbatlardır, hücre duvarı inhibisyonu, protein sentezi inhibisyonu, DNA ve RNA sentezi inhibisyonu ile hareket ederler. Şelatlaştırıcılar; aralarında disodyum etilendiamintetraasetik asit (EDTA), polifosfatlar ve sitrik asitin bulunduğu, farmasötik bileşenle kompleksi oluşturan ve farmasötik formülasyonun bozulmasını önleyen ajanlardır (Constantinides vd., 2004).

### 2.3.5. Farmasötik Süspansiyonlarda Kullanılan Koruyucular

Sodyum benzoat, potasyum sorbat ve metil hidroksibenzoat genellikle sıvı farmasötik

preparatlarda koruyucu olarak kullanılır. Sıvı preparatlar, içeriklerinin doğası nedeniyle mikrobiyal büyümeye özellikle duyarlıdır. Bu tür müstahzarlar, ürün formülasyonunun değiştirilmesini ve bozulmasını önleyen koruyucuların eklenmesiyle korunur (Davis, 1970). Sıvı farmasötik preparatların korunmasında en yaygın olarak kullanılan koruyucular arasında sodyum benzoat, potasyum sorbat ve metil hidroksibenzoat (metilparaben) bulunur. Tipik izin verilen konsantrasyonları sırasıyla %0.1-0.2, %0.1-0.2 ve %0.1-0.25 aralığındadır (ağırlık / ağırlık) (Beringer & Felton, 2006).

Herhangi bir farmasötik formda, formun içeriğine göre ve uygulama yoluna yönelik süspansiyonlar, bakteri, maya ve küf kontaminasyonuna karşı koruma sağlamak için uygun antimikrobiyal ajanlar içermelidir.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. PROPOLİS ÖRNEKLERİ

Propolis örnekleri, Düzce ilinin Gölyaka ve Çilimli bölgelerinde arıcılık yapan arıcılardan 2019 yılı, Ağustos, Eylül ve Ekim aylarında temin edilmiştir.

#### 3.2. PROPOLİS EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI

Düzce Bölgesi'nden toplanmış propolis örnekleri 100 gramlık numuneler halinde -20°C'de 1 hafta donduruldu Ardından laboratuvar tipi blenderda toz haline getirildi. Toz halindeki örnekler, ekstre haline getirilene kadar -20°C'de saklandı (Kurt vd., 2020).



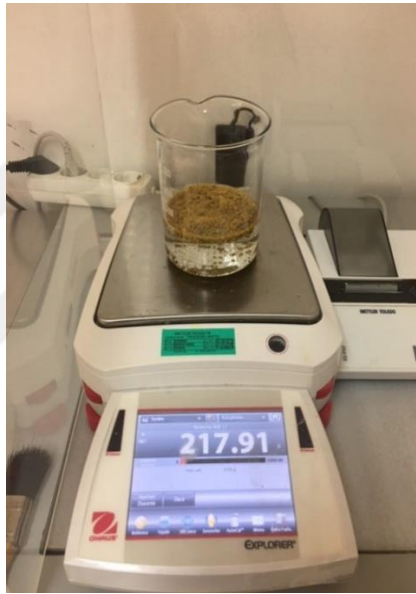
Şekil 3.1. Ham propolis.



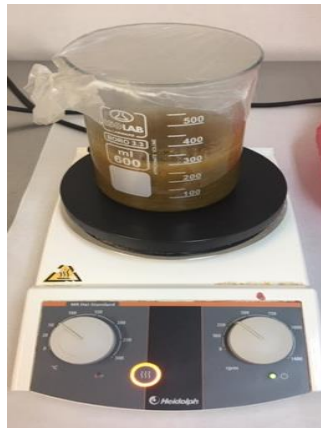
Şekil 3.2. Ham propolis.

### 3.2.1. Sulu Ekstraksiyon Hazırlanması

40 g toz propolis 400 ml saf suyla karıştırıldı. Karışım 48 saat boyunca, karanlık ortamda, 30°C’de maserasyon işlemine tabii tutuldu. Maserasyon işlemi esnasında manyetik karıştırıcı ve ısıtıcı kullanılarak sıcaklık 30°C sabitlenirken, manyetik karıştırma işlemine de tabii tutuldu. 48 saatin sonunda karışım Watmann no:4 filtreden süzöldü. Süzölen ekstrakt 0.2 µ’luk, tek kullanımlık Sartorius filtreden süzöldü. Ardından elde edilen ekstraktın nem içeriği üzerinden miktar tayini Karl Fischer cihazında yapıldı. Kalan süzölmüş numuneler amberli cam şişelerde, 2-8°C’de saklanmıştır.



Şekil 3.3. Sulu ekstrakt.



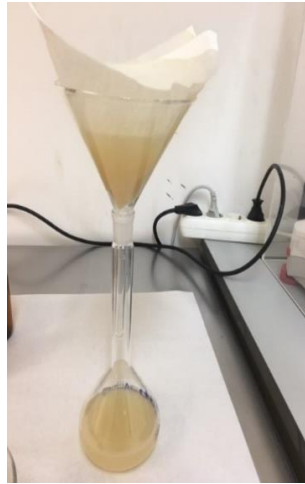
Şekil 3.4. Sulu ekstrakt.



Şekil 3.5. Sulu ekstrakt.



Şekil 3.6. Sulu ekstrakt.



Şekil 3.7. Sulu ekstrakt.



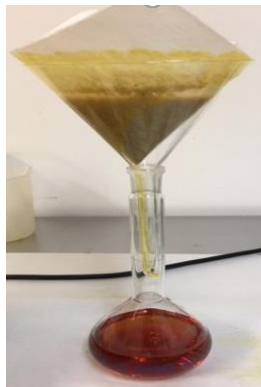
Şekil 3.8. Sulu ekstrakt.

### 3.2.2. Etanolik Ekstraksiyon Hazırlanması

40 g toz propolis 400 ml %70'lik etanol çözeltisiyle 30 dk boyunca 320 W ultrasonik banyoda karıştırıldı. Sonrasında, Watmann no:4 filtreden süzüldü. Süzülen ekstrakt 0.2  $\mu$ 'luk, tek kullanımlık Sartorius filtreden süzüldü. Ardından elde edilen ekstraktın nem içeriği üzerinden miktar tayini IR nem cihazında 105°C'de tayin edildi. Kalan süzölmüş numuneler amberli cam şişelerde, 2-8°C'de saklandı (Trusheva vd., 2007).



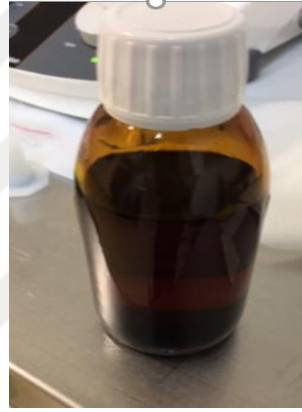
Şekil 3.9. Etanolik ekstrakt.



Şekil 3.10. Etanolik ekstrakt.



Şekil 3.11. Etanolik ekstrakt.



Şekil 3.12. Amberli cam şişede numune.

### **3.3. PROPOLİS EKSTRELERİNİN TOPLAM FLAVANOİD VE FENOLİK MADDE TAYİNİ**

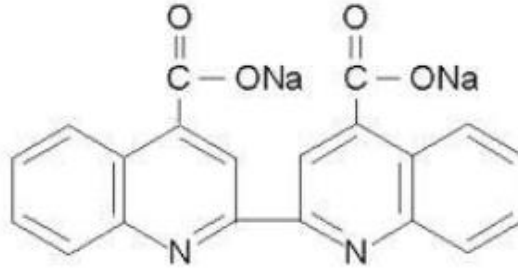
#### **3.3.1. Toplam Fenolik Madde ve Flavanoid Tayini için Numune Hazırlama**

Yaklaşık 5 g ekstrakt bir falkon tüpe tartılıp 15 mL metanol eklenerek ekstraksiyon işlemi çalkalayıcıda 20 dk süreyle yapıldı. Süre sonunda adi süzgeç kağıdından berrak oluncaya kadar süzüldü. Süzüntünün son hacmi belirlendi, süzüntü fenolik ve flavanoid testlerinde kullanıldı.

#### **3.3.2. Folin- Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenolik Madde Tayini**

Numunedeki toplam çözülebilir fenolik madde Folin-Ciocalteu reaktifi ile 760 nm de

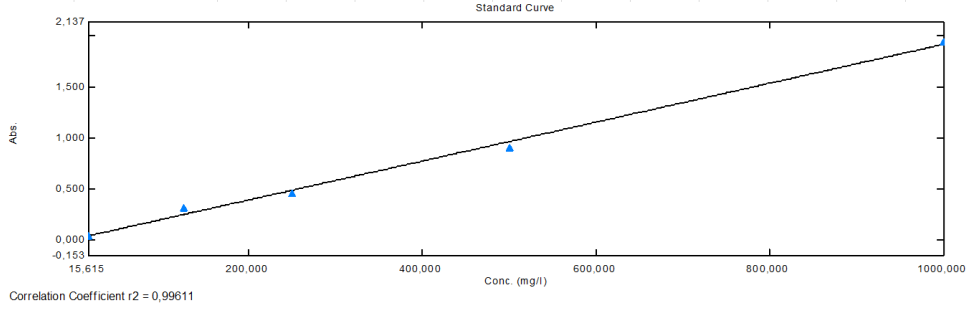
maksimum absorbans veren renkli bir kompleks oluşturur (Slinkard & Singleton, 1977). Gallik asit ile eşdeğerine göre hesaplama yapıldı ve standart grafiği hazırlanarak miktar tayin yapıldı. Toplam fenolik madde tayini için Shimadzu UV 1800 Spektrofotometre cihazı kullanıldı. Okumalar 760 nm’de gerçekleştirildi (Singleton & Rossi, 1965).



Şekil 3.13. Fenolin reaktifinin yapısı.

Fenolik madde tayini için, 5 ml Folin reaktifi alındı ve 20 ml’ye saf suyla tamamlandı. Standart olarak 10 mg Gallik asit (GA) tartıldı ve 10 ml’ye metanolle tamamlanarak karıştırıldı; bu karışımdan 500; 250; 125; 62.5; 31.25; 15.625 ppm olacak şekilde seri standartlar hazırlandı. Seri standartlar her bir ekstrakt için ayrı ayrı hazırlandı. Seri standartlar hazırlandıktan sonra her bir standart için şu adımlar izlendi; renk belirteci olarak %10’luk sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) çözeltisi hazırlandı. Sonrasında 10  $\mu\text{g}$  propolis ekstresi numunesi alındı ve 340  $\mu\text{L}$  saf su ile karıştırıldı. Bu karışıma 200  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi ve bekletilmeden karıştırıldı. 3 dakika beklenmesinin ardından 200  $\mu\text{L}$ , %10’luk sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) karışıma ilave edildi ve karışım 2-3 saat boyunca oda sıcaklığında, ışık almayan bir ortamda bekletildi. Karışımda renk değişimleri belirginleşince 760 nm dalga boyunda, saf suya karşı absorbans değerli Shimadzu UV 1800 Spektrofotometre cihazında okutularak fenolik madde miktarları belirlendi. Bu işlem üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı ve absorbans değerlerinin aritmetik ortalamaları alınarak standart grafiği oluşturuldu.

Grafik üzerinde verilen formül kullanılarak etanolik ve sulu ekstraktlerdeki toplam fenolik içerik belirlendi. Grafiğe ait y eksenindeki değerler numunenin absorbans değerini, x eksenindekiler ise numunelerin konsantrasyonunu ifade etmektedir. Değerler grafiğe ait formülde yerine konduğu zaman elde edilen sonuç, numunedeki toplam fenolü polifenol içeriği (mg GA/L olarak) cinsinden vermektedir.



Şekil 3.14. Toplam polifenol (mgGA/L) standart grafiği.

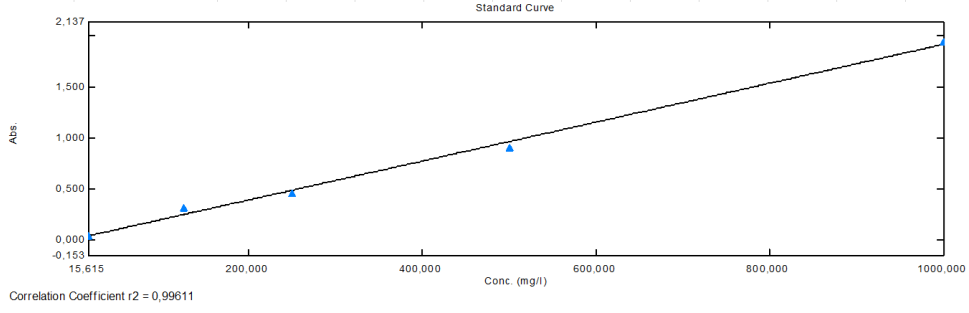
### 3.3.3. Toplam Flavanoid İçeriğinin Tayini

Alüminyum klorür ( $AlCl_3$ ) kolorimetrik yöntemi ile toplam flavanoid içeriğine bakıldı. Kuersetin eşdeğerliğine göre flavanoid içeriği hesaplandı. Okumalar UV Spektrofotometre cihazıyla, 415 nm’de yapıldı.

Toplam flavanoid için 1000 ppm stok kuersetin (QE) standardı hazırlandı ve seri seyreltme ile 250; 125; 62.5; 31.25; 15.625 ppm olacak şekilde 6 farklı standart elde edildi. %2’lik  $AlCl_3$  çözeltisi hazırlandı. Numunelerde bulanıklaşma olması durumunda numuneler tekrar 45  $\mu$ l’lik enjeksiyon filtresinden geçirildi.

Numunenin toplam flavanoid içeriğinin belirlenmesi için alüminyum klorür kolorimetrik metodu kullanıldı (Chandra vd., 2014). Kuersetinse standart kalibrasyon eğrisi oluşturulabilmek için standart olarak kullanıldı. 1000 ppm’lik kuersetin stok olarak kullanıldı, stok çözelti metanolla seyreltilerek 250; 125; 62.5; 31.25; 15.625 ppm olacak şekilde 6 farklı seri elde edildi. Numuneler için hazırlanan 4 flakona öncelikle saf su konuldu sonra 0.5 ml numune ve 0.5  $AlCl_3$  eklendi. Bulanıklık oluşması durumunda numuneler 45 $\mu$ l’lik filtreden tekrar geçirildi. Hazırlanan standartlar için de falkonlara saf su; 0.5 standart; 0.5 ml  $AlCl_3$  konuldu. Numuneler ve standartların  $AlCl_3$ ’süz blankleri hazırlandı. Flakonlar vorteksledi ve 415 nm’ de UV cihazında ölçümleri yapıldı. Bu işlem üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı ve absorbans değerlerinin aritmetik ortalamaları alınarak standart grafiği oluşturuldu.

Grafik üzerinde verilen formül kullanılarak etanolik ve sulu ekstraktlerdeki toplam flavanoid içeriği belirlendi. Grafiğe ait y eksenindeki değerler numunenin absorbans değerini, x eksenindekiler ise numunelerin konsantrasyonunu ifade etmektedir. Değerler grafiğe ait formülde yerine konduğu zaman elde edilen sonuç, numunedeki toplam kuersetin içeriği (mgQE/L olarak) cinsinden vermektedir.



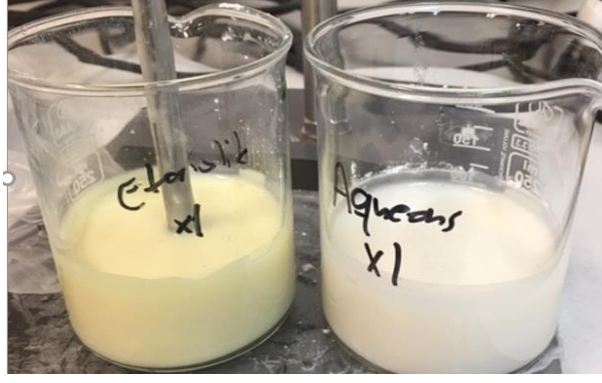
Şekil 3.15. Toplam flavanoid (mgQE/L olarak) standart grafiği.

### 3.4. ORAL SÜSPANSİYONUN ÖZELLİKLERİ, KORUYUCU İÇERİĞİ VE ÜRETİM METODU

Alanjezik ve ateş dürücü özelliklere sahip, çoğunlukla pediatrik hastalarda kullanılan, antimikrobiyal koruyucu olarak sodyum propil paraben (sodyum nipasol) ve sodyum metil paraben (sodyum nipajin) içeren bir süspansiyon referans ürün olarak seçilmiştir. Referans ürüne karşı üretilen propolis ekstraktlı test ürünler kullanılmıştır.

Test ürün formülasyonu geliştirilirken, referans ürün baz alınarak formülasyon geliştirilmiş, doğal koruyucular çıkarılmamış, yapay koruyucular yerineyse (nipajin ve nipasol) sulu ve etanolik propolis ekstraktları 0.5, 1, 2 ve 4 katı oranında kullanılmıştır. Ayrıca formül geliştirilirken tatlandırıcılar, kıvam arttırıcılar ve süspansiyonlaştırıcı ajanlar ve saf su başta olmak üzere çeşitli eksipiyanlar kullanılmıştır. Üretimde mekanik karıştırıcı ve homojenizatör kullanılmıştır. Üretim koşulları C class ilaç üretim şartlarında gerçekleştirilmiştir. Koku takibi yapabilmek için doğal veya yapay aroma kullanılmamıştır. Renk değişimini gözlemlemek adına boyar katkı maddeleri formülasyonlarda kullanılmamıştır.

Kontrol grubu olarak ayrıca nipajin, nipasol ve propolis ekstraktı içermeyen ürün de üretilmiştir.



Şekil 3.16. Etanolik ve sulu ekstrakt içeren test ürünler.



Şekil 3.17. Etanolik ekstrakt içeren test ürün.



Şekil 3.18. Homojenizasyon işlemi.

Üretimler tamamlandıktan sonra, tüm ürünler 100 ml'lik mezürle ölçülüp, 100 ml'lik amberli cam şişelere konmuştur ve 28/20 pp vistop kapak kullanılarak şişelenmiştir ve her biri formülasyonuna göre kodlanarak, üretim tarihleri de yazılarak etiketlenmiştir.

Tüm numuneler 40 °C'de %75 bağıl nem içeren etüvlerde 1. Hafta, 2. Hafta ve 1.ayda takibe alınmıştır. Başlangıç numuneleri de dahil olmak üzere her periyot için 4 sulu, 4

etanolik ekstraktlı, 1 referans formülasyonlu ve bir koruyucusuz numuneler hazırlanmıştır.

### 3.5. MİKROBİYOLOJİK ANALİZLER

40°C'de %75 bağıl nem içeren etüvlerde takibe alınan numunelerde ve başlangıç numunelerinde toplam aerobik mikroorganizma, toplam küf/maya, E.Coli ve S.Aureus bakılmıştır. E. Coli için Tryptic Soy Broth (TSB), MacConkey Broth (MCB), MacConkey Agar (MCA), Eosin Methylene Blue Agar kullanılmıştır. S. Aureus için TSB ve Mannitol Salt Agar (MSA) kullanılmıştır. Toplam aerobik mikroorganizma ve küf/maya için Tryptic Soy Agar (TSA) ve Sabouraud Dextrose Agar (SDA) kullanılmıştır. Her bir numune için çift ekim yapılmıştır. Ayrıca seyreltme amaçlı peptonlu NaCl çözeltisi kullanılmıştır.

Yukarıdaki mikrobiyolojik ortamlar belirlenirken Amerikan Farmakopesi (United States Pharmacopeia – USP) ve Avrupa Farmakopesi (European Pharmacopeia - EP) kaynak olarak alınmıştır (European pharmacopeia 2018).

Tüm ekimler için ortak olarak peptonlu çözelti hazırlandı; numune hazırlama ve ön inkübasyon için 1 gramdan az olmayacak şekilde 10'da 1 seyreltme kullanarak bir numune hazırlandı ve uygun bir miktarı aşılacak için 10 mL'ye karşılık gelecek şekilde 90 ml peptona eklendi ve karıştırıldı (European pharmacopeia 2018).

E.coli için şu adımlar izlenir; peptonlu karışımdan 10 ml alınarak TSB'ye eklendi ve karıştırıldı ve 30-35 ° C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra TSB karıştırıldı ve içerisinden 1 ml alınarak 100 ml MacConkey Broth (MCB)' eklendi, 42-44 ° C'de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası MacConkey Agar (MCA) ve Eosin Methylene Blue Agar'a MCB'den ekim yapıldı ve 18-72 saat boyunca 30-35 ° C'de inkübe edildikten sonra sayım yapıldı. E. Coli'nin olası varlığında Kolonilerin büyümesi, olası E. coli varlığını gösterdi (European pharmacopeia 2018).

S. Aureus için şu adımlar izlenir; peptonlu karışımdan 10 ml alınarak TSB'ye eklendi ve karıştırıldı ve 30-35 ° C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra TSB karıştırıldı ve mannitol salt agar (MSA)'a ekim yapıldı ve 18-72 saat boyunca 30-35 ° C'de inkübe edildi. S. aureus'un olası varlığında, sarı bir bölge ile çevrili sarı / beyaz kolonilerin büyümesi ile gözlemlendi (European pharmacopeia 2018).

Küf/maya için şu adımlar izlenir; peptonlu karışımdan 10 ml alınarak Sabouraud-dextrose broth'a eklendi ve 30-35 ° C'de 3-5 gün inkübe edildi. İnkübasyondan sonra Sabouraud-dextrose agara ekim yapıldı ve 30-35 ° C'de 24-48 saat inkübe edildi. Küf/maya olası varlığında, beyaz kolonilerin büyümesi ile gözlemlendi (European pharmacopeia 2018).

Toplam aerobik mikroorganizma için şu adımlar izlenir; peptonlu karışımdan TSA'ya ekim yapılır ve 30-35 ° C'de 3-5 gün inkübe edilir. Aerobik bakteri varlığında kolonilerin oluşumu gözlemlendi.



#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Propolis, arılar tarafından bileşimi değiştirilmeyen bitkilerden elde edilen bir arı ürünüdür (Bankova vd. 2000, Simone vd. 2010). Ham propoliste balzam içeriği, mumlar, nem ve izole edilebilir maddelerin değerlendirilmesi genellikle propolis kalitesinin bir göstergesi olarak kullanılır. Geleneksel tıpta kullanılan propolis ekstraktı genellikle %70 etanolle hazırlanır (Gardana vd., 2007). Bileşiklerin doğal matrislerden ekstraksiyonu için klasik teknikler, çözücülerin karıştırma ve / veya ısıtma ile kullanımına dayanmaktadır. En yaygın olanlar arasında kullanılan teknikler soxhlet ekstraksiyonu, maserasyon, ultrasonik ekstraksiyon, mikrodalga ekstraksiyonu veya süper kritik sıvıların kullanımınıdır (Wang vd., 2006). Etanol veya bir etanol / su karışımı kullanılarak sürekli çözücü yenileme ile maserasyon ekstraksiyonu propoliste uygulanan en yaygın yöntemdir (Gómez-Caravaca vd., 2006) ancak aseton veya kloroform gibi farklı organik çözücüler de kullanılmaktadır. Sulu ekstraksiyonlar, fenolik asitler ve lipofilik fenolik bileşiklerin çözünmemesi sebebiyle daha düşük bir verim göstermektedir (Gómez-Caravaca vd., 2006). Cunha vd. (2004) (Gómez-Caravaca vd., 2006) etanol kullanarak maserasyon, maserasyon ile solvent yenileme ve soxhlet ekstraksiyonu (ışıklı ve ışiksiz) kullanarak ekstraksiyon verimlerini karşılaştırdı. Soxhlet ekstraksiyonu ile maksimum verimle ekstrakt elde edilmesine rağmen maserasyon yöntemiyle daha fazla fenolik madde elde edilmiştir. Z. Yildirim et al (2004) kullandığı sulu ekstraksiyon metodu baz alınarak bu çalışmada kullanılmıştır. İlgili çalışmada 50 gram ham propolis, pH 7.2'de 150 ml damıtılmış suda çözülerek %25'lik karışım oluşturulmuş ve vorteks oluşturarak 48 saat karıştırılmıştır. Elde edilen sulu özüt süzülüp bir G-3 borosilikat membrandan geçirilmiş ve su vakum altında buharlaştırılmıştır. Elde edilen reçine kullanılacağı zaman 7.5 gramı 92.5 ml damıtılmış suda çözülerek %7.5'lük sulu çözültisi oluşturulmuştur. Bu çalışmada %10 luk propolis-su karışımı 30°C'de 48 saat maserasyon işlemine tabi tutulduktan sonra Watmann no:4'ten süzülmüştür. KF metoduna göre miktar tayini %0.55 bulunmuştur. Ancak bu miktar hiç su içermemektedir. Metotta vakum altında elde edilen reçinenin su içeriği veya miktar tayini/kuru madde miktarı bildirilmediğinden, verim kıyaslaması yapmak mümkün değildir. Trusheva et al (2007) yaptıkları çalışmada, etanolik ekstraktın ultrasonik banyoda daha kısa tutulmasına rağmen maserasyona göre

daha yüksek fenolik madde ve flavanoid verimine sahip olduğunu bildirmişlerdir (Trusheva vd., 2007). %10'luk hazırlanan propolis-etanol karışımı 300 W ultrasonik bir banyoda 30 dakika 25 ° C'de tutulmuştur. Ardından süzölmüştür. Bu çalışmada aynı oranda etanol-propolis karışımı hazırlanarak buz aküleriyle birlikte ultrasonik su banyosuna yerleştirilerek sıcaklık 25° C'de sabit tutulmuştur. Karışım 30 dakika boyunca burada karıştırılmıştır. Ardından Watmann no:4'ten süzölmüştür. Halojen metoduna göre miktar tayini %0.77 bulunmuştur. Metotta miktar tayini/kuru madde miktarı bildirilmediğinden, verim kıyaslaması yapmak mümkün değildir.

Etanolik ve sulu ekstraktların eldesinden sonra içeriğinde katı madde miktarı olarak toplam propolis belirlenerek, referans üründeki yapay koruyucu toplamına eş değer olacak şekilde katı madde içeren ekstraktlar üretimde kullanılmıştır. Birçok çalışmada su veya organik çözeltiler vakum evaporatörlerle düşük sıcaklık ve yüksek basınçla uçurulup katı madde elde edildikten sonra kullanılmaktadır. Ancak bu çalışmada uygulanan prosesler saf su içerdiğinden ve ayrıca ısıtma prosedürü bulunduğundan (40-80 °C arası, minimum 2 saat) organik çözeltilerin bu aşamada evapore olacağı bilinmektedir. Ayrıca kurutma işlemleri uzun saatler almakta ve bazı uçucu yağların da kaybına sebep olabilmektedir. Bu sebepler dolayısıyla bu çalışmada miktar tayini yapılırken sulu ekstrakt için Karl Fischer (KF), etanolik ekstrakt için halojen nem cihazı kullanılmıştır. Karl Fischer titrasyonu, kristalizasyon suyu ve yüzeyde emilen su dahil olmak üzere yalnızca suyu algılayan ve ölçen çok özel bir belirleme yöntemidir. Baz, alkol ve sülfür dioksit varlığında su ve iyot içeren bir redoks reaksiyonuna dayanır. Su-iyot reaksiyonu suyun varlığına bağlıdır ve bu nedenle reaksiyonda kullanılan reaktifin titresi, başka bir su kaynağı olmadığından numunedeki su miktarını yansıtır. KF reaktifi iyot içerir ve toplam suyla tamamen reaksiyona girdiğinde, solüsyonda fazla iyot belirerek renk değişikliğine ve çift platin elektrotla tespit edilebilen elektrometrik bir değişikliğe neden olur. KF titrasyonu toplam suyu ölçer ve artık uçucu çözücülerin varlığından etkilenmez. Su içeriği %100'den 1 ppm'e kadar geniş ve hassas bir tayin aralığına sahiptir (Bruttel & Schlink, 2003). Halojen nem cihazı, termogravimetrik bir ölçümdür: numune tartılır ve bir kızılötesi radyatörle (halojen lamba) ısıtılır. Ağırlık kaybı sürekli olarak kaydedilir ve tanımlanmış bir kritere ulaşıldığında kurutma sona erer. Bu kriterler genellikle süre ve sıcaklık sınırlamasıdır. Ancak nemi bilinmeyen bir madde kullanıldığında genellikle zaman kriteri konulmadan işlem sürdürülür. Nem içeriği, ağırlık farkından otomatik olarak hesaplanır. Termogravimetrik ölçüm sırasında, kütle kaybı yalnızca seçici olarak

su kaybına atanamaz çünkü su dışındaki maddeler ısıtıldığında buharlaşabilir. Bu nedenle genellikle organik çözücü içeren numunelerde kullanılır.

Sulu ekstrakt KF metoduyla titrasyona tabi tutulduğunda nem oranı %99.45 gelmiştir. Bu durumda kullanılan numunenin %0.55 içeriği katı propolistir. Diğer yandan etanolik ekstrakt halojen nem cihazında %99.23 sonucunu vermiştir. Bu numunede katı madde oranı %0.77'tir. Etanolün suya göre propolisi daha fazla çözdüğü göz önünde bulundurulduğunda çıkan sonuçlar doğrulanmaktadır (Kubiliene vd., 2015). Bulunan sonuçlara göre test ürünlere eklenecek katı miktarları üzerinden ekstre miktarları hesaplanmıştır. Kullanılan koruyucu madde oranları miligram cinsinden olduğundan, kullanılan ekstrakt oranları da oldukça düşük olmuştur.

Ilıman bölge propolisleri, fenolik bileşikler, özellikle fenolik asitler, flavonoidler (flavonlar, flavanonlar ve dihidroflavonoller) açısından zengin bir içeriğe sahiptir (Falcão vd., 2010). UV-VIS spektrofotometre kullanarak, Folin-Ciocalteu metodu ile fenolik bileşikleri ve  $AlCl_3$  metodu ile toplam fenolik bileşik miktarını belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen propolis numunelerindeki toplam fenol ve flavonoidlerdeki bileşim, hidro-alkolik ekstraksiyondan sonra birkaç spektrofotometrik prosedürle belirlendi. Bu hızlı, basit ve güvenilir iki metot, aktif bileşiklerin miktarının belirlenmesine sağladı (Popova vd., 2004). Toplam fenolik içerik kolorimetrik Folin-Ciocalteu yöntemi ile elde edilirken, toplam flavanoid madde için karbonil ve hidroksil grupları alüminyum klorür ile reaksiyona girerek,  $\lambda = 415$  nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Doğal özütler için Folin-Ciocalteu yöntemiyle hesaplanan toplam fenolikler sıklıkla gallik asitle eşdeğer terimlerle ifade edilir. Folin-Ciocalteu yöntemi genel karşılaştırmalı sonuçlar verir, ancak farklı bileşik veya fenolik sınıflarının belirlenmesi spesifik değildir.

Folin- Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde tayini yapılmıştır. Gallik asit eşdeğerine göre hesaplama yapılmıştır. Toplam fenolik madde tayini Shimadzu UV 1800 Spektrofotometre cihazıyla yapılmıştır. Standart fenolik bileşik olarak ise gallik asit kullanılmıştır. Okumalar 760 nm'de yapılmıştır. Alüminyum klorür ( $AlCl_3$ ) kolorimetrik yöntemi ile toplam flavonoid içeriğine bakıldı. Kuersetin eşdeğerliğine göre bakıldı. Toplam flavanoid madde tayini Shimadzu UV 1800 Spektrofotometre cihazıyla yapılmıştır. Standart flavanoid bileşik olarak ise kuersetin kullanılmıştır. Okumalar 415 nm'de yapılmıştır. Düzce Üniversitesi, Kimya A.B.D. laboratuvarları kullanılmıştır. UV-Vis Spektrofotometrede 420 nm'de numuneler ölçümlenmiştir. Her numune için 3 kez tekrar yapılmıştır.

Çizelge 4.1. Flavanoid madde analiz işlemi.

	<b>KÖR</b>	<b>STANDART</b>	<b>NUMUNE</b>
<b>Saf su</b>	3500 µl	3000 µl	3000 µl
<b>Standart</b>		500 µl	
<b>Numune</b>			500 µl
<b>%10 AlCl<sub>3</sub></b>	500 µl	500 µl	500 µl
Son hacim 4000 µl oldu.			
Tüpler vortexlenir. 60 dk bekletildi.			
415 nm' de okutuldu.			

Çizelge 4.2. Fenolik madde analiz işlemi.

	<b>KÖR</b>	<b>STANDART</b>	<b>NUMUNE</b>
<b>Saf su</b>	1400 µl	1360 µl	1360 µl
<b>Standart</b>		40 µl	
<b>Numune</b>			40 µl
<b>0.5 N Folin reaktifi</b>	800 µl	800 µl	800 µl
<b>%10 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	800 µl	800 µl	800 µl
Son hacim 3000 µl olur.			
Tüpler vortexlenir. 30 dk bekletilir.			
<b>760 nm' de okutulur.</b>			

Çizelge 4.3. Toplam fenolik-flavanoid miktarları.

<b>Ekstrakt adı</b>	<b>Fenolik madde (mgGA/L)</b>	<b>Fenolik madde (mgGA/g)</b>	<b>Flavanoid (mgQE/L)</b>	<b>Flavanoid (mgQE/g)</b>
<b>Sulu-1</b>	926.9	2.781	68.68	0.206
<b>Sulu-2</b>	615.69	1.847	59.69	0.170
<b>Sulu-3</b>	783.17	2.350	65.23	0.196
<b>Etanolik-1</b>	13788.25	41.365	10872.24	32.618
<b>Etanolik-2</b>	11734.3	35.203	10149.92	30.450
<b>Etanolik-3</b>	12126.8	36.380	10523.99	31.572

Farklı etanolik ekstraksiyon yöntemleriyle çalışmadaki sonuç kıyaslandığında fenolik içeriği diğer çalışmalara göre düşük kalırken flavanoid içeriği daha yüksek gelmektedir (Yavuz 2011, Sahin vd. 2011).

Doğal antibiyotik olarak da bilinen propolisle yapılan çalışmalarda, güçlü bir antibakteriyel ve antifungal etkisi olduğu görülmüştür. (Ghisalberti 1979, Pepeljnjak vd. 1981, 1982, Pápay vd. 1985, Toth ve Papay vd. 1986, Petri vd. 1988, Rosenthal vd. 1989, Brumfitt vd. 1990, Cuéllar vd. 1990, Soboleva vd. 1990, Dimov vd. 1991, Dobrowolski vd. 1991; Kujumgiev ve vd. 1993).

Boyanova ve arkadaşları, %30 etanolik propolis ekstraktını ve kontrol grubu olarak da etanolü kullanarak 38 ayrı *H. pylori* klinik izolatının üremesine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, propolisin etanole göre anlamlı bir farkla bu suşların üremesini inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir ve sonuç olarak Bulgar propolisinin *H. pylori*'ye karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır (Boyanova vd., 2003). Aynı araştırmacılar daha geniş çaplı yaptıkları 94 izolat üzerine etkisinde de benzer sonuçlara ulaşmış ve daha ileri mikrobiyolojik, farmakolojik ve klinik çalışmalar gerektiği üzerinde durmuşlardır (Boyanova vd., 2005). Serra ve Escola propolisin antibakteriyel etkilerini araştırmışlar, MİK (minimum inhibitör konsantrasyonu) değerlerini *S. aureus* için 60-80 µg/ml ve *E. coli* için 600- 800 µg/ml olarak bulmuşlardır. Sonuçlar ışığında, propolisin

gram pozitif mikroorganizmalara gram negatif olanlara göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu etkinin propolis fenolik ve flavonoid bileşiklerden kaynaklandığını bildirmişlerdir (Serra & Escola 1995). Öte yandan, Nieva ve arkadaşları, Arjantin propolisinin etanolik ekstresinin antibakteriyel aktivitesini incelemiş ve gram-pozitif bakteriler üzerine düşük konsantrasyonda etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (Borges-Walmsley vd., 2002). Benzer şekilde, Küba propolisinin de önemli düzeyde antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Rubio vd., 1999). Türkiye propolisinde de benzer antimikrobiyal etki çalışmaları yapılmıştır;

Propolisin Gram pozitif bakterilere karşı oldukça etkili ancak Gram negatif bakterilere düşük düzeylerde etkili olduğunu bildirmişlerdir (Keskin vd., 2001). Silici ve arkadaşları etanolik ekstraktın *S. aureus* bakterisine karşı yüksek, *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* a karşı zayıf antibakteriyel aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir (Silici & Kutluca, 2005). Ayrıca ülkemizde elde edilen propolis örneklerinin, *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı oldukça güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu da bildirilmiştir (Popova vd., 2005).

Bu çalışmada yapılan mikrobiyolojik analizlerde, son ürün olarak farmasötik bir oral süspansiyon oluşturulmuş ve içerisine aynı ürünün referansındaki toplam yapay antibakteriyel koruyucu oranının 0.5, 1, 2 ve 4 katı kadar etanolik ve sulu ekstraktan eklenmiştir ve toplamda 8 adet farklı ekstrakt koruyucu oranına sahip formülasyonla birlikte bir adet referans ürün ve bir adet de koruyucusuz formülün mikrobiyolojik üremeleri gözlemlenmiştir. Tüm test ve referans ürünlerde stabilite takibi yapılmıştır. Hızlandırılmış stabilite bir son ürünün veya etken olarak kullanılan bir hammaddenin raf ömrünü, saklama koşullarını, hammaddeyse retest/tekrar test süresinin, ısı, ışık, nem gibi belirli faktörler altında belirlenmesidir (Etkin maddelerin ve bitmiş ürünlerin stabilite testlerine ilişkin kılavuz 2017). Stabilite koşulları belirlenirken Dünya üzerindeki 4 farklı iklim koşulu baz alınır (Evaluation for stability data 2003).

Çizelge 4.4. İklim-stabilite koşulları çizelgesi.

<b>Bölge</b>	<b>İklim koşulu</b>	<b>Nem</b>	<b>Sıcaklık</b>
Zone I	Ilıman kuşak	%45 RH $\pm$ %5 RH	21°C $\pm$ 2°C

Çizelge 4.4. (devam) İklim-stabilite koşulları çizelgesi.

Zone II	Akdeniz/Subtropikal kuşak	%60 RH $\pm$ %5 RH	25°C $\pm$ 2°C
Zone III	Sıcak kurak kuşak	%35 RH $\pm$ %5 RH	30°C $\pm$ 2°C
Zone IVa	Sıcak nemli/tropikal kuşak	%65 RH $\pm$ %5 RH	30°C $\pm$ 2°C
Zone IVB	Sıcak yüksek nemli kuşak	%75 RH $\pm$ %5 RH	30°C $\pm$ 2°C

Stabilite koşullarının dışında bir de stres koşulları bulunmaktadır. Bu koşullar bozunma yollarını belirleyerek bozunma ürünlerinin tanımlanmasını ve molekülün kesin stabilitesinin belirlenmesi kolaylaştırır (Anonim., 2003). Bu çalışmada uygulanmayan ancak süspansiyon stabilite takiplerinde uygulanan in-use/kullanım içi koşullar da bulunmaktadır. Kullanım içi stabilite testinin amacı (uygun olduğu durumlarda) çok dozlu bir ürünün primer ambalajı açıldıktan sonra kabul edilen bir spesifikasyon dahilinde kaliteyi korurken kullanılabilmesi süreyi belirlemektir (Note for guidance on in-use stability testing of human medicinal products 2001). Bu çalışma primer ambalajı ürün kullanımı süresince açılıp kapanabilen, aynı ambalajın birden fazla kez kullanıldığı ürünlerde ürün stabilitesini gözlemlemek amacıyla yapılmaktadır. Test parametreleri olarak renk, netlik, kapanma bütünlüğü, partiküler madde, partikül boyutu gibi fiziksel özellikler, kimyasal özellikler bakımından miktar tayini, antimikrobiyal koruyucu ve antioksidan miktar tayinleri, degradasyonlar ve pH ve mikrobiyolojik olarak da toplam bakteri ve sterilitate testleri yapılır (Note for guidance on in-use stability testing of human medicinal products 2001). Bu çalışmada stres koşulları olan 40 °C’de %75 bağıl nem şartlarındaki etüvlerde tüm numuneler belirli periyotlarda çıkarılıp mikrobiyal üremenin gözlemlenmesi için stres koşullarında stabiliteye alınmıştır. Periyot olarak başlangıç, 1.hafta, 2.hafta, 1.ay ve 2.ay belirlenmiştir. Her periyodun bitimindeki gün ürünler etüvlerden çıkarılıp oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiştir ve sonrasında analize alınmışlardır. Kalan numuneler analizlerin bitimi beklenerek 2-8 °C’de beklenmiştir. Analizi biten numuneler “Tehlikeli Atıkların Kontrolü Yönetmeliği”ne göre imha edilmesi sağlanmıştır (Tehlikeli Atıkların Kontrolü Yönetmeliği 2005).

Aşağıdaki çizelgelerde ürünlerin içeriği ve isimleri ve mikrobiyolojik analizlerin sonuçları verilmiştir;

Çizelge 4.5. Ürün içerik ve isim çizelgesi.

Ürün adı	Ürün içeriği
Orijinal	Referans ürün
KZK	Koruyucusuz
A 1/2	Orijinal koruyucu oranının 0.5 katı kadar sulu ekstrakt içeren numune
A 1	Orijinal koruyucu oranının 1 katı kadar sulu ekstrakt içeren numune
A 2	Orijinal koruyucu oranının 2 katı kadar sulu ekstrakt içeren numune
A 4	Orijinal koruyucu oranının 4 katı kadar sulu ekstrakt içeren numune
E 1/2	Orijinal koruyucu oranının 0.5 katı kadar etanolik ekstrakt içeren numune
E 1	Orijinal koruyucu oranının 1 katı kadar etanolik ekstrakt içeren numune
E 2	Orijinal koruyucu oranının 2 katı kadar etanolik ekstrakt içeren numune
E 4	Orijinal koruyucu oranının 4 katı kadar etanolik ekstrakt içeren numune

Şekil 4.1. Mikrobiyolojik analiz sonuçları.

Numune Adı	Başlangıç				1. Hafta				2. Hafta				1. Ay				2. Ay			
	TA	TK	E. Coli	S. Aureus	TA	TK	E. Coli	S. Aureus	TA	TK	E. Coli	S. Aureus	TA	TK	E. Coli	S. Aureus	TA	TK	E. Coli	S. Aureus
Orijinal																				
KZK																				
A 1/2	2	2			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A 1	2	2			+	+			+	+			+	+			+	+	+	+
A 2	1	2			1	2			1	1			2	2			+	+	+	+
A 4	1	1			2	2			1	1			1	1			2	2	2	2
E 1/2																	+	+	+	+
E 1																	+	+		
E 2																				
E 4																				

Propolis suda az çözünürken en iyi çözücüsü etanoldür. Mikrobiyolojik analiz sonuçları ve fenolik madde ve toplam flavanoid içerikleri kıyaslandığında anlamlı bir benzerlik görülmektedir. Etanolik ekstrakt yüksek fenolik madde ve flavanoid içeriğine sahipken bu oran sulu ekstraktta düşük gelmiştir ve ürünlere eklendikleri konsantrasyonlar da etkililikleri üzerinde değişikliğe yol açmıştır. Sulu ekstraktların tamamında tüm periyotlar boyunca üreme gözlemlenmiştir. Stres koşullarının süresi uzadıkça üreme de artmıştır.

Ayrıca üremenin artmasıyla birlikte açık beyaz olan başlangıç ürünlerinin koyu krem/gri arası renk aldığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda koruyucusuz numunede üreme olmadığı koşullarda dahi sulu ekstrede üreme gözlemlenmiştir, bu üremenin nedeni olarak çözünmüş madde miktarının düşük ve su içeriğinin yüksek olması düşünülmektedir. Su içeriğinin ekstrede yüksek olması, ekstrede üremeyi hızlandırmış ve ürüne etki ederek bozunmasına sebep olabileceği düşünülmektedir. Etanolik ekstrakt içeren ürünlerdeyse, referans (orijinal) ürünün içeriğindeki yapay antimikrobiyal koruyucunun yarısı ve aynı oranında etanolik ekstrakt içeren numunelerde 1.aya kadar üreme gözlemlenmezken, 1.ve 2.aylarda aerobik bakteriler ve küflerde üreme gözlemlendiği görülmektedir. Bununla birlikte gram pozitif ve gram negatif bakterilerde üreme ve üremenin olduğu aylarda renk değişimleri gözlemlenmemiştir ancak başlangıç numunelerine göre koku farklılığı oluşmuştur. Referans ürünle aynı sonucu veren numuneler orijinal koruyucu oranın 2 ve 4 katı kadar etanolik ekstrakt içeren numuneler olmuştur. Bu numunelerde renk ve koku değişimleri meydana gelmemiştir. Ayrıca tüm mikrobiyolojik ekimler sonuç sağlaması yapabilmek adına 2 adet yapılmıştır ve bunların sonuçların birbirleriyle uyumlu gelmiştir. Toplam fenolik ve flavanoid içeriğinin yüksek olduğu etanolik ekstraktların antimikrobiyal koruyuculuğunun da yüksek olduğu bu çalışmada belirlenmiştir. Ancak gram pozitif (*S. aureus*) ve gram negatif (*E. coli*) bakterilere etkisi belirgin bir şekilde görünmemiştir. Etanolik ve sulu ekstraktların her ikisine ait farklı dozlardaki sonuçlarda gram pozitif ve negatif için üreme açısından birbirine paralel sonuçlar gelmiştir; bir numunenin ilgili periyodunda ya her iki mikroorganizma da üremiş ya da her ikisi de ürememiştir. Kontrol grubu olan koruyucusuz numune bu değerlendirmenin dışında tutulmuştur.

USP'ye göre aşağıdaki çizelgelerde yer alan testler mikrobiyolojik testlerde kullanıldığı seçicilik sağlamaktadır. Yani aynı anda birkaç mikroorganizmayı değil, sadece tek bir suşu göstererek belirleyiciliği arttırmaktadır.

Çizelge 4.6. E.coli için mikrobiyal testler.

MacConkey broth	Üremeyi destekler	E. coli
	Üremeyi inhibe eder	S. aureus
MacConkey agar	Üremeyi destekler + belirtir	E. coli

Çizelge 4.7. S. aureus için mikrobiyal testler.

Mannitol salt agar	Üremeyi destekler + belirtir	S. aureus
	Üremeyi inhibe eder	E. coli

Avrupa Birliği İyi İmalat Uygulamaları Kılavuzu (Guidelines on good manufacturing practice 2011) Ek 1, steril tıbbi ürünlerin üretimi esnasında sağlanması gereken çevresel koşulları ve farklı sınıflardaki temiz oda ve temiz bölgelerin uygun şekilde gerçekleştirilmesini ve standartlarını belirtir. Derece A aseptik dolun ve üretim gerektiren, ampul, vial gibi aseptik dolun bağlantıları gerektiren alanları ifade eder. Derece B aseptik hazırlama ve doldurma gerektiren A sınıfı bölge öğeleri için arka plan ortamı sağlar, örneğin derece A üretim alanının koridorları bu derece olabilir. C ve D olarak derecelendirilmiş alanlar, üretim sürecinde daha az kritik aşamalarda gerçekleştirilen daha az kritik görevleri gerçekleştirmek için kullanılır. Kısaca özetlemek gerekirse D'den A'ya gidildikçe temizlik derecesi yükselmektedir. Burada kastedilen derece içerideki havanın partikül büyüklüğünü belirleyen hava filtre sistemleridir. İçeriye gönderilen hava her derecede farklı büyüklükteki filtrelerden süzülerek verilir. A'dan D'ye gidildikçe bu değer artmaktadır. Aşağıda birim m<sup>3</sup> hacimde izin verilen partikül sayısına göre odaların derecelendirilmesi verilmiştir (Guidelines on good manufacturing practice 2011);

Çizelge 4.8. İzin verilen maksimum parçacık sayısı/m<sup>3</sup>.

Derece	Durgun	Durgun	İşletme	İşletme
Sınıf	0.5 µm/m <sup>3</sup>	0.5 µm/m <sup>3</sup>	0.5 µm/m <sup>3</sup>	0.5 µm/m <sup>3</sup>
A	3520	20	3520	20
B	3520	29	352000	2900
C	352000	2900	3520000	29000
D	3520000	29000	Tanımlanmamış	Tanımlanmamış

Bu şartlara göre bu çalışmada üretimi yapılan süspansiyona C derece temiz oda uygun bulunarak, o sınıfa ait şartlarda üretim yapılmıştır.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın amacı, Düzce yöresinde yaygın bir şekilde yapılan arıcılığın yan ürünlerinden biri olan propolise katma değer kazandırarak bölge ve ülke ekonomisine katkı sağlamaktır. Bir diğer amaçsa bu katkıların yanında propolise alternatif kullanım alanlarını oluşturarak hem propolisi farklı yönleriyle literatüre ve ekonomiye kazandırmak hem de yapay ilaç antimikrobiyal koruyucularına alternatif geliştirmektir. Ülkemizde yaygın olarak yapılan arıcılık faaliyetlerini bu yolla belirli bir standart altına almak da bu yolla mümkün olabilir. İlaç sanayiinde uygulanan sınırları çok net ifade edilmiş kurallar propolis, bal ve diğer arı ürünler üretimlerini de standardize edebilmek adına arıcılık doğasına uygun biçimde uyarlanabilir. Bu bakımdan ilaç sanayisi için de yeni bir hammadde kaynağı oluşturulmuş olacaktır.

Paraben bazlı yapay koruyucuların farmasötikler ve kozmetik ürünlerde birçok ülkede yasaklanmasının veya kullanımının kısıtlanması, alternatif arayışlarını arttırdı. Bu noktada propolis hem antimikrobiyal hem de antifungal özellikleri sebebiyle, ideal bir antimikrobiyal koruyucu rolündedir. Yapay koruyucuların yan etkilerinin fazla olması, pediatrik ve 65 yaş üstü hastalarda bu etkilerin daha belirgin hissedilmesi ve daha çok yaşanması, bunlara ek olarak propolisin antimikrobiyal etkisinin yanında sağlığa faydalı ek özelliklerinin olması, bu alanda kendine büyük bir pazar payı oluşturabileceğini göstermektedir. Yapılan bu çalışmada, propolisin belirli konsantrasyonlarda paraben bazlı yapay koruyucularla aynı şekilde koruma sağladığını kanıtlamıştır. Daha önce çeşitli çalışmalarda yardımcı madde olarak kullanılan propolisin farmasötik anlamda kullanılması bu çalışmayı öncü çalışmalar arasına sokmakta ve propolisin kullanımına yeni bir bakış açısı getirmektedir. Çalışmanın güvenilirliğini arttırmak adına stres koşulları uzatılarak aynı farmasötik formlarda aynı koruyuculara karşı, katı hale getirilerek katı farmasötik formlarda ve hem katı hem de sıvı olarak yarı katı ürünlerde aynı işlevde kullanımı araştırılarak farmasötik sanayiine kazandırılabilir ve in-use stabilite de takip edilebilir. Ayrıca yüksek fenolik ve flavanoid içeriğine sahip numunenin uzun süreli antimikrobiyal koruyuculuğu sağladığı görüldüğünden, farklı etanolik ekstraksiyon yöntemleri denenerek yüksek verimli numuneler kullanılarak, düşük oranlarda yüksek koruyuculuk denemeleri de göz önünde bulundurulabilir.

Henüz farmasötik ekspiyanı olarak propolisin kullanılması anlamda belirgin çalışmaların yapılmamış olması propolisin bu alanda yeni çalışmalara açık olduğunu göstermektedir ve bu konuda çalışmalar yapılmalıdır. Ayrıca ekspiyan olarak kullanılmanın yanında antibiyotik, antimikrobiyal ve antiviral özellikleri sayesinde etken madde olarak da çalışmalarda yer almalıdır. Son dönemlerde artan antibiyotik dirençleri ve viral enfeksiyonlara karşı alternatif bir çalışma alanı olarak değerlendirilebilir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abdel-Rahman, M. A., & Mosaad, G. M. (2013). Effect of propolis as additive on some behavioural patterns, performance and blood parameters in Muscovy broiler ducks. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 3(2), 64-68.
- Aga, H., Shibuya, T., Sugimoto, T., Kurimoto, M., & Nakajima, S. (1994). Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(5), 945-946.
- Ali, F. H., Kassem, G. M., & Atta-Alla, O. A. (2010). Propolis as a natural decontaminant and antioxidant in fresh oriental sausage. *Veterinaria italiana*, 46(2), 167-172.
- Aly, S. A., & Elewa, N. A. (2007). The effect of Egyptian honeybee propolis on the growth of *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin biosynthesis in Ras cheese. *The Journal of dairy research*, 74(1), 74.
- Aytaç, S. & Yiğen, Ç. (2016). Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanım Alanları. *III. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu*.
- Bakkaloğlu, Z., & Arıcı, M. (2019). Farklı Çözücülerle Propolis Ekstraksiyonunun Toplam Fenolik İçeriği, Antioksidan Kapasite ve Antimikrobiyal Aktivite Üzerine Etkileri. *Academic Food Journal/Akademik Gıda*, 17(4).
- Bankova, V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2.
- Bankova, V. (2009). Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(2), 23-28.
- Bankova, V. S., de Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., & Kadota, S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy research*, 15(7), 561-571.

- Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S., & Namba, T. (1996). Four di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19(11), 1479-1484.
- Başer, K. H. C. (1998). Tıbbi ve aromatik bitkilerin endüstriyel kullanımı. *Tab Bülteni*, 13(14), 19-43.
- Battaa, A. M., Awadien, N. B., & Eid, Y. Z. The Use Of Bee Propolis As A Source Of Natural Additives To Improve The Productive Performance And Immune System Of Local Chickens.
- Bayrak, N. (2005). *Arı ürünlerinin (bal, arı sütü, polen ve propolis) mikrofloralarının ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi* (Doctoral dissertation, Yüksek lisans tezi, Fırat Üniv. FBE, Elazığ).
- Bayram, E., Kırıcı, S., Tansi, S., Yılmaz, G., Kızıl, O. A. S., & Telci, İ. (2010). Tıbbi ve aromatik bitkiler üretiminin artırılması olanakları. *TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi (2010)*, 11-15.
- Beringer, P., & Felton, D. A. (2006). Remington: The science and practice of pharmacy 21st Edition.
- Bernardi, S., Favaro-Trindade, C. S., Trindade, M. A., Balieiro, J. C. C., Cavenaghi, A. D., & Contreras-Castillo, C. J. (2013). Italian-type salami with propolis as antioxidant. *Italian Journal of Food Science*, 25(4).
- Bogdanov, S., & Bankova, V. (2012). The propolis book, chapter 1.
- Borges-Walmsley, M. I., Chen, D., Shu, X., & Walmsley, A. R. (2002). The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends in microbiology*, 10(2), 80-87.
- Borrelli, F., Izzo, A. A., Di Carlo, G., Maffia, P., Russo, A., Maiello, F. M., & Mascolo, N. (2002). Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia*, 73, S38-S43.
- Boyanova, L., Derejian, S., Koumanova, R., Katsarov, N., Gergova, G., Mitov, I., & Krastev, Z. (2003). Inhibition of *Helicobacter pylori* growth in vitro by Bulgarian propolis: preliminary report. *Journal of Medical Microbiology*, 52(5), 417-419.

- Boyanova, L., Gergova, G., Nikolov, R., Derejian, S., Lazarova, E., Katsarov, N., & Krastev, Z. (2005). Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *Journal of medical microbiology*, 54(5), 481-483.
- Brumfitt, W., Hamilton-Miller, J. M. T., & Franklin, I. (1990). Antibiotic activity of natural products: 1. Propolis. *Microbios*, 62(250), 19-22.
- Bruttel, P., & Schlink, R. (2003). Water determination by Karl Fischer titration. *Metrohm monograph*, 8(026), 50003.
- Buckle, J. (2003). Evidence-based aromatherapy in nursing practice. *Clinical Aromatherapy. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone*, 116(32), 10-33.
- Campo Fernández, M., Cuesta-Rubio, O., Rosado Perez, A., Montes De Oca Porto, R., Márquez Hernández, I., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. (2008). GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(21), 9927-9932.
- Castaldo, S., & Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, S1-S6.
- Chandra, S., Khan, S., Avula, B., Lata, H., Yang, M. H., ElSohly, M. A., & Khan, I. A. (2014). Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: A comparative study. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2014.
- Chen, C. N., Wu, C. L., Shy, H. S., & Lin, J. K. (2003). Cytotoxic prenylflavanones from Taiwanese propolis. *Journal of Natural Products*, 66(4), 503-506.
- Cherniak, N. F. (1973). Synergistic effects of propolis and some antibacterial agents. *Antibiotiki*, 18(3), 259.
- Cingi, M. İ., & Erol, K. (1996). Farmakoloji. *Anadolu üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Ders Kitapları Yayın No*, 108.
- Constantinides, P. P., Tustian, A., & Kessler, D. R. (2004). Tocol emulsions for drug solubilization and parenteral delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 56(9), 1243-1255.

- Craker, L. E., & Gardner, Z. (2003, February). Sustaining the harvest: Challenges in MAP production and markets. In *III WOCMAP Congress on Medicinal and Aromatic Plants-Volume 2: Conservation, Cultivation and Sustainable Use of Medicinal and* 676 (pp. 25-30).
- Crane, E. (1979). The past and present importance of bee products to man in bee production: properties, application and apitherapy. *New York Plenum Press, 1, 13*.
- Cuellar Cuellar, A., Rojas Hernandez, N. M., & Martinez Perez, J. (1990). New antimicrobial structure from propolis collected in Cuba. *Revista Cubana de Farmacia, 24(1)*, 51-58.
- Cuesta-Rubio, O., Frontana-Uribe, B. A., Ramírez-Apan, T., & Cárdenas, J. (2002). Polyisoprenylated Benzophenones In Cuban Propolis; Biological Activity Of Nemorosone. *Zeitschrift für Naturforschung C, 57(3-4)*, 372-378.
- Daugusch, A., Moraes, C. S., Fort, P., & Park, Y. K. (2008). Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 5*.
- Davis, P. H. (1970). Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 3. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 3*.
- de Albuquerque, I. L., Alves, L. A., Lemos, T. L., Dorneles, C. A., & de Morais, M. O. (2008). Constituents of the essential oil of Brazilian green propolis from Brazil. *Journal of Essential Oil Research, 20(5)*, 414-415.
- De Almeida, E. C., & Menezes, H. (2002). Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *Journal of Venomous Animals and Toxins, 8(2)*, 191-212.
- de Castro Ishida, V. F., Negri, G., Salatino, A., & Bandeira, M. F. C. (2011). A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chemistry, 125(3)*, 966-972.
- Dimov, V., Ivanovska, N., Manolova, N., Bankova, V., Nikolov, N., & Popov, S. (1991). Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. *Apidologie, 22(2)*, 155-162.
- Donadieu, Y. (1979). La propolis. Editions Maloine, Paris.

- Dosage form and route of administration 2019, Viewed 31 July 2020, <<https://www.fda.gov/industry/fda-resources-data-standards/dosage-form-and-route-administration>>.
- Erdem, G. B. (2002). Propolisin diş çürüklüğü oluşumuna etkisinin sıçan dişlerinde araştırılması. *Teknik Arıcılık*, 77, 27-28.
- Ernst, E. (2000). The usage of complementary therapies by dermatological patients: a systematic review. *British journal of dermatology*, 142(5), 857-861.
- Etkin maddelerin ve bitmiş ürünlerin stabilite testlerine ilişkin kılavuz 2017, Viewed 31 July 2020, <<https://titck.gov.tr/storage/legislation/P22DZYMR.pdf>>.
- European pharmacopeia 2018, Viewed 31 July 2020, <<https://pheur.edqm.eu/app/10-1/search/>>.
- Evaluation for stability data 2003, Viewed 31 July 2020, <[https://database.ich.org/sites/default/files/Q1E\\_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q1E_Guideline.pdf)>.
- Excipient labelling 2007, Viewed 31 July 2020, <[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general\\_content\\_001683.jsp&mid=WC0b01ac05808c01f6](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_001683.jsp&mid=WC0b01ac05808c01f6)>.
- Fahmy, F. G., & Omar, M. O. M. (1989). Effect of propolis extracts on certain potato viruses. In *Proceedings of the Fourth International Conference on Apiculture in Tropical Climates, Cairo, Egypt, 6-10 November 1988/hosted by the government of Egypt; convened by the International Bee Research Association*. London: International Bee Research Association, 1989.
- Falcão, S. I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L. M., Barros, C., Domingues, M. R., & Cardoso, S. M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(2), 887-897.
- Farooqui, T., & A Farooqui, A. (2010). Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: a critical review. *Current Nutrition & Food Science*, 6(3), 186-199.
- Faydaoğlu, E., & Sürücüoğlu, M. S. (2011). Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 11(1), 52-67.

- Gao, J. X., Chen, H. Y., & Lu, Z. Y. (2011). The Influence of Propolis on Bifidobacteria And Lactobacillus in Yogurt. *Chinese Journal of Disinfection*, (2), 21.
- Gardana, C., Scaglianti, M., Pietta, P., & Simonetti, P. (2007). Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45(3), 390-399.
- Gekker, G., Hu, S., Spivak, M., Lokensgard, J. R., & Peterson, P. K. (2005). Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of ethnopharmacology*, 102(2), 158-163.
- Ghisalberti, E. L. (1979). Propolis: a review. *Bee world*, 60(2), 59-84.
- Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1220-1234.
- Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1220-1234.
- Göktaş, Ö., & Gıdık, B. (2019). Tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanım alanları. *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(1), 145-151.
- Guidelines on good manufacturing practice 2011, Viewed 31 July 2020, <[https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4\\_en](https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4_en)>.
- Hamdy, M. H., El-Banby, M. A., Khakifa, K. I., Gad, E. M., & Hassanein, E. M. (1989). antimicrobial effect of honey in the management of septic wounds. In *Proceedings of the Fourth International Conference on Apiculture in Tropical Climates, Cairo, Egypt, 6-10 November 1988/ hosted by the government of Egypt; convened by the International Bee Research Association*. London: International Bee Research Association, 1989.
- Han, S. K., & Park, H. K. (1995). A study on the preservation of meat products by natural propolis: effect of EEP on protein change of meat products. *Korean Journal of*

- Animal Science (Korea Republic).*
- Hofmann, U., Holst, H., & Schlosser, E. (1989). Studies of the effect of plant protection agents on the susceptibility of grapevines to *Plasmonara viticola* 2. Results of an infection trial. *Wein-Wissenschaft*, 44, 61-65.
- International Standard 2012, Viewed 18 June 2020,  
<<https://www.sis.se/api/document/preview/915445/>>.
- Japanese Pharmacopoeia (JP 15), (2008). General Information 12. Microbiological Quality of Non-Sterile Pharmaceutical Preparations and Substances for Pharmaceutical Use.
- Japanese Pharmacopoeia Fifteenth Edition (2007). Microbial Attributes of Non-sterile Pharmaceutical Products as it appears in Supplement I to the.
- Karahancı, O. N., Öztoprak, Ü. Y., Ersoy, M., Ünsal, Ç. Z., Hayırlıdağ, M., & Büken, N. Ö. (2015). Geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamaları yönetmeliği ile yönetmelik taslağı'nın karşılaştırılması. *Türkiye Biyoetik Dergisi*, 2(2), 117-126.
- Katalinić, V., Radić, S., Ropac, D., Mulić, R., & Katalinić, A. (2004). Antioxidative activity of propolis from Dalmatia (Croatia). *Acta medica Croatica: casopis Hrvatske akademije medicinskih znanosti*, 58(5), 373-376.
- Keskin, N., Hazir, S., Baser, K. H. C., & Kürkçüoğlu, M. (2001). Antibacterial activity and chemical composition of Turkish propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 56(11-12), 1112-1115.
- Koc, A. N., Silici, S., Mutlu-Sariguzel, F., & Sagdic, O. (2007). Antifungal activity of propolis in four different fruit juices. *Food Technology and Biotechnology*, 45(1), 57-61.
- Krell, R. (1996). *Value-added products from beekeeping* (No. 124). Food & Agriculture Org.
- Kubiliene, L., Laugaliene, V., Pavilionis, A., Maruska, A., Majiene, D., Barauskaite, K., & Savickas, A. (2015). Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 156.

- Kujumgiev, A., Bankova, V., Igantova, A., & Popov, S. (1993). Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. *Pharmazie*, 48(10), 785-786.
- Kumar, S. A. (2009). Plants-based Medicines in India. *Retrieved in February, 15, 2013*.
- Kumazawa, S., Nakamura, J., Murase, M., Miyagawa, M., Ahn, M. R., & Fukumoto, S. (2008). Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behavior observation and phytochemical analysis. *Naturwissenschaften*, 95(8), 781.
- Kumazawa, S., Yoneda, M., Shibata, I., Kanaeda, J., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2003). Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51(6), 740-742.
- Kumova, U. (2002). Önemli bir arı ürünü: Propolis. *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 2(2), 10-24.
- Kunrath, C. A., Savoldi, D. C., Mileski, J. P. F., Novello, C. R., Alfaro, A. D. T., Marchi, J. F., & Tonial, I. B. (2017). Application and evaluation of propolis, the natural antioxidant in Italian-type salami. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20.
- Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., & Krol, W. (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Kurt vd. (2020). Propolisin alternatif kullanım alanlarının oluşturulması: İlaçta antimikrobiyal koruyucu madde olarak propolis kullanımı. *Dergipark*. Yayına hazırlık aşamasında (Ağustos 2020).
- Kurt, E., Bavbek, S., Pasaoglu, G., Abadoglu, O., & Misirligil, Z. (2004). Use of alternative medicines by allergic patients in Turkey. *Allergologia et immunopathologia*, 32(5), 289-294.
- La Torre, A., Guccione, M., & Imbroglini, G. (1990). Preliminary observations on the action of propolis-based preparations on Botrytis cinerea on strawberry. *Apicoltura*, (6), 169-177.
- Lejeune, B., Pourrat, A., & Dehmouche, H. (1988). Propolis: utilisation en dermocosmétologie. *Parfums, cosmétiques, arômes*, (82), 73-77.
- Lewin, R. (2000). *Modern insanın kökeni*, TÜBİTAK popüler bilim kitapları, Çeviri: N.

- Lotti, C., Campo Fernandez, M., Piccinelli, A. L., Cuesta-Rubio, O., Marquez Hernandez, I., & Rastrelli, L. (2010). Chemical constituents of red Mexican propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2209-2213.
- Mani, F., Damasceno, H. C. R., Novelli, E. L. B., Martins, E. A. M., & Sforcin, J. M. (2006). Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *Journal of ethnopharmacology*, 105(1-2), 95-98.
- Meireles, M. A. A. (Ed.). (2008). *Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications*. CRC press.
- Mereste, L., & Mereste, L. (1988). Sensitivity of Bacillus larvae to an extract of propolis in vitro. *Medycyna Weterynaryjna*, 44(3), 169-170.
- Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., & Calder, P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological research*, 152(3), 239-246.
- Moreton, C. (2010). Functionality and Performance of Excipients in a Quality-by-Design World. *American Pharmaceutical Review*, 2.
- Negri, G., Marcucci, M. C., Salatino, A., & Salatino, M. L. F. (1998). Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes from Brazil. *Apidologie*, 29(4), 305-314.
- Nielsen, P. B., Müllertz, A., Norling, T., & Kristensen, H. G. (2001). The effect of  $\alpha$ -tocopherol on the in vitro solubilisation of lipophilic drugs. *International journal of pharmaceutics*, 222(2), 217-224.
- Note for guidance on in-use stability testing of human medicinal products 2001, Viewed 31 July 2020, < [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-use-stability-testing-human-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-use-stability-testing-human-medicinal-products_en.pdf) >.
- Okonenko, L. B. (1988). Salmonella infections and propolis. *Zdravookhr. kaz*, 1, 55-57.
- Özhatay, N., & Atay, S. (1997, October). Kekik in trade in Turkey. In *Proceeding of the XI World Forestry Congress* (Vol. 3, pp. 234-237).
- Pápay, V., Tóth, L., & Soltész, M. (1985). Pharmacological activities of fractions and isolated compounds of Hungarian propolis and Populi gemma. *Proc 30th Int Congr Apiculture Nagoya, Japan, Apimondia, Bucharest, Romania*, 465-468.

- Papay, V., Toth, L., Soltesz, M., Nagy, E., & Litkei, G. (1986). Isolated compounds from Hungarian propolis and populi gemma. *Stud Org Chem (Amst)*, 23, 233-240.
- Pepeljnjak, S., Jalsenjajk, I., & Maysinger, D. (1981). Influence of microencapsulated propolis extract on bacillus-subtilis strain ip-5832. *Acta Pharmaceutica Jugoslavica*, 31(1), 27-32.
- Pereira, A. D. S., Seixas, F. R. M. S., & Aquino Neto, F. R. D. (2002). Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, 25(2), 321-326.
- Petri, G., Lemberkovics, E., & Foldvari, M. (1988). Examination of differences between propolis (bee glue) produced from different floral environments. *Developments in food science*.
- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A. G., ... & Bogdanov, S. (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 15(4), 235-240.
- Popova, M., Silici, S. İ. B. E. L., Kaftanoglu, O., & Bankova, V. (2005). Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*, 12(3), 221-228.
- Popova, M., Trusheva, B., Antonova, D., Cutajar, S., Mifsud, D., Farrugia, C., ... & Bankova, V. (2011). The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chemistry*, 126(3), 1431-1435.
- Popravko, S. A. (1978). Chemical composition of propolis, its origin and standardization A remarkable hive product: Propolis, Apimondia Publ.
- Price, L. (2011). How essential oils enter the body. *Aromatherapy for health professionals*, 125-139.
- Quality Risk Management 2005, Viewed 15 June 2020, <[https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use\\_en-3.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-3.pdf)>.
- Rasgele, P. G., & Kekecoglu, M. Investigation of Phenolic Content of Propolis Produced

- in Yigilca District of Duzce Province in Western Black Sea Region of Turkey. *Apiterapi ve Doğa Dergisi*, 1(2), 20-28.
- Regulation, C. (1991). Council Regulation (EEC) No. 2092/91 of 24 June 1991 on organic production of agricultural products and indications referring thereto on agricultural products and foodstuffs. *Official Journal L*, 198(22), 07.
- Rojas Hernandez, N. M., & Cuétara Bernal, K. D. L. (1990). Antibiotic effect of propolis against strains of *Staphylococcus aureus* of human clinical origin. *Revista Cubana de Farmacia*, 24(1), 45-50.
- Rosenthal, C., Tamarin, R., Samish, S., & Elad, D. (1989). Demonstration on the inhibitory effect of propolis on microbial strains. *Proc XXXI Ind Int Congr Apiculture Rio Janeiro, Brazil, Apimondia, Bucharest, Romania*, 224.
- Rubio, O. C., Cuellar, A. C., Rojas, N., Castro, H. V., Rastrelli, L., & Aquino, R. (1999). A polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. *Journal of Natural Products*, 62(7), 1013-1015.
- Sahin, H., Aliyazicioglu, R., Yildiz, O., Kolayli, S., Innocenti, A., & Supuran, C. T. (2011). Honey, pollen, and propolis extracts show potent inhibitory activity against the zinc metalloenzyme carbonic anhydrase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 26(3), 440-444.
- Salatino, A., Teixeira, É. W., & Negri, G. (2005). Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2.
- Schippmann, U., Leaman, D. J., & Cunningham, A. B. (2002). Impact of cultivation and gathering of medicinal plants on biodiversity: global trends and issues. *Biodiversity and the ecosystem approach in agriculture, forestry and fisheries*.
- Serra, J., & ESCOLA, R. (1995). A study of the bacteriostatic activity of propolis. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 91(8), 242-246.
- Šeruga, M., Novak, I., & Jakobek, L. (2011). Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 124(3), 1208-1216.
- Serkedjieva, J., Manolova, N., & Bankova, V. (1992). Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic

- acids). *Journal of Natural Products*, 55(3), 294-297.
- Sheskey, R. C. R. P. J., & Owen, S. C. (2006). *Handbook of Pharmaceutical Excipients 5th Ed/Raymond C Rowe & Paul J Sheskey/Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association 2006*. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association 2006.
- Silici, S. (2003). Propolisin bazı antimikrobiyal ve farmakolojik aktiviteleri üzerine bir araştırma. Çukurova Üniversitesi. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Adana*. (Silici, 2003).
- Silici, S., & Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of ethnopharmacology*, 99(1), 69-73.
- Simone-Finstrom, M., & Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, 41(3), 295-311.
- Simuth, J., Trnovský, J., & Jelokova, J. (1986). Inhibition of bacterial DNA-dependent RNA polymerases and restriction endonuclease by UV-absorbing components from propolis. *Die Pharmazie*, 41(2), 131-132.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Siqueira, A. B. S., Rodriguez, L. R. N. D. A., Santos, R. K. B., Marinho, R. R. B., Abreu, S., Peixoto, R. F., & Gurgel, B. C. D. V. (2015). Antifungal activity of propolis against *Candida* species isolated from cases of chronic periodontitis. *Brazilian oral research*, 29(1), 1-6.
- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*, 28(1), 49-55.
- Soboleva, V. A. (1990). Comparison of the antibacterial and anti-inflammatory activities of soft dosage forms with different bases. *Farmatsevtichnyi Zhurnal*, (5), 68-69.
- Sorkun, K., Süer, B., & Salih, B. (2001). Determination of chemical composition of Turkish propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 56(7-8), 666-668.

- Şarışen, Ö., & Çalışkan, D. (2005). Fitoterapi: bitkilerle tedaviye dikkat (!). *Sted*, 14(8), 182-187.
- Tanrıkulu, N. (2014). Kozmetik Bitkileri Tarımı ve Türkiye Florasının Kozmetik Bitkileri Açısından Önemi. 4. *Kozmetik Kimyası, Üretimi, Standardizasyonu Kongresi, Kimyagerler Derneği*.
- Tehlikeli Atıkların Kontrolü Yönetmeliği 2005, Viewed 11 August 2020, <<https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2005/03/20050314-1.htm>>.
- Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M., & Park, Y. K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2013.
- Trusheva, B., Trunkova, D., & Bankova, V. (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 1(1), 13.
- Uerpmann-Witzack, R. (2017). European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM).
- Uzel, A., Önçağ, Ö., Coğulu, D., & Gençay, Ö. (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological research*, 160(2), 189-195.
- Vermathen, M., Louie, E. A., Chodosh, A. B., Ried, S., & Simonis, U. (2000). Interactions of water-insoluble tetraphenylporphyrins with micelles probed by UV-Visible and NMR spectroscopy. *Langmuir*, 16(1), 210-221.
- Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.
- Yang, W., Wu, Z., Huang, Z. Y., & Miao, X. (2017). Preservation of orange juice using propolis. *Journal of food science and technology*, 54(11), 3375-3383.
- Yildirim, Z., Hacievliyagil, S., Kutlu, N. O., Aydın, N. E., Kurkcuoğlu, M., Iraz, M., & Durmaz, R. (2004). Effect of water extract of Turkish propolis on tuberculosis infection in guinea-pigs. *Pharmacological Research*, 49(3), 287-292.
- Yücel, B. (2004). Apiterapi; Arı ürünlerinin insan sağlığı üzerindeki önemi. *Ege*

*Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi, Çiftçi Broşürü, 56.*



# ÖZGEÇMİŞ

## KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Dicle KURT  
Doğum Tarihi ve Yeri : 06.03.1987 – Bursa  
Yabancı Dili : İngilizce  
E-posta : dclbaran @icloud.com

## ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Gıda Müh. (%100 İngilizce)	Gaziantep Üniversitesi	2015
Lise	Fen Bilimleri	Yalova Fatih Sultan Mehmet Lisesi	2004

## YAYINLAR

Propolisin alternatif kullanım alanlarının oluşturulması: İlaçta antimikrobiyal koruyucu madde olarak propolis kullanımı