

BÖLGESEL FARKLILIK VE DEPOLAMA SÜRESİNİN PROPOLİSİN ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Naci Ömer Alayunt*

Siirt Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Siirt, Türkiye

Geliş / Received: 27.03.2019; Kabul / Accepted: 09.10.2019; Online baskı / Published online: 15.10.2019

Alayunt, N.Ö. (2019). Bölgesel farklılık ve depolama süresinin propolisin antioksidan özellikleri üzerine etkisi. *GIDA* (2019) 44 (6): 969-979 doi: 10.15237/gida.GD19063.

Alayunt, N.Ö. (2019). The effect of regional difference and storage time on antioxidant properties of propolis. GIDA (2019) 44 (6): 969-979 doi: 10.15237/gida.GD19063.

ÖZ

Propolis, geleneksel tıpta kullanılan fenolik ve flavonoid bileşikler, terpenler ve tokoferol gibi daha birçok biyoaktif madde içeren bir karışımdır. Üç farklı bölgede *Apis Mellifera Caucasicus* arı türlerinden toplanan propolis örnekleri, Haziran ayında ve 8 ay oda sıcaklığında depolama süreci sonunda Şubat ayında 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile antioksidan-oksidan parametre ölçümleri yapılmıştır. B1 vitamini ($44.24 \pm 5.04 - 64.48 \pm 5.12$ µg/g), B2 vitamini ($66.13 \pm 2.44 - 104.42 \pm 3.85$ µg/g), A vitamini ($3.58 \pm 0.09 - 17.44 \pm 0.25$ µg/g), E vitamini ($15.88 \pm 1.38 - 38.64 \pm 2.75$ µg/g), malondialdehit (MDA) ($0.381 \pm 0.020 - 1.419 \pm 0.023$ nmol/mL) ve DPPH ($95.42 \pm 1.22 - 368.22 \pm 4.31$ mg/L) düzeyleri gözlemlenmiştir. Sonuçlar ortalama±standart sapma ve $P < 0.05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir. Yüksek rakımlı bölgelerde elde edilen propolisin, Haziran ayında yapılan analizinde en iyi antioksidan özellik gösterdiği tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Raf ömrü, iklim ve çevresel koşullara bağlı olarak propolis örneklerinde antioksidan düzeylerin değişiklik gösterdiği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Antioksidan, depolama, malondialdehit, propolis, vitaminler

THE EFFECT OF REGIONAL DIFFERENCE AND STORAGE TIME ON ANTIOXIDANT PROPERTIES OF PROPOLIS

ABSTRACT

Propolis is a mixture of many other bioactive substances such as phenolic and flavonoid compounds, terpenes and tocopherol used in traditional medicine. The antioxidant-oxidant parameter measurements of propolis, obtained from *Apis Mellifera Caucasicus* bee species in three different regions, were performed in June and at the end of 8 months room temperature storage process in February with 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazil (DPPH) and high performance liquid chromatography (HPLC). Vitamin B1 ($44.24 \pm 5.04 - 64.48 \pm 5.12$ µg / g), vitamin B2 ($66.13 \pm 2.44 - 104.42 \pm 3.85$ µg / g), vitamin A ($3.58 \pm 0.09 - 17.44 \pm 0.25$ µg / g), vitamin E ($15.88 \pm 1.38 - 38.64 \pm 2.75$ µg / g), malondialdehyde (MDA) ($0.381 \pm 0.020 - 1.419 \pm 0.023$ nmol / mL) and DPPH ($95.42 \pm 1.22 - 368.22 \pm 4.31$ mg/L) levels were observed. Results were accepted as mean±standard deviation and $P < 0.05$ significance level. Propolis obtained from high altitude regions showed the best antioxidant properties in June analysis ($P < 0.05$). Antioxidant levels are thought to vary in propolis samples depending on shelf life, climate and environmental conditions.

Keywords: Antioxidant, storage, malondialdehyde, propolis, vitamins

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ nacialayunt@hotmail.com,

☎ (+90) 484 212 1111/4101

☎ (+90) 484) 223 1998

GİRİŞ

Genel olarak “arı tutkalı” olarak bilinen propolis, bal arılarının, belirli enzimler ve balmumu içeren tükürüklerini esas olarak yaprak ve çiçek tomurcuklarından toplanan, birçok ağaç türünün kabuk çatlaklarından toplanan eksüda ile karıştırarak ürettiği reçineli bir karışımdır. Propolis, kovan içlerinde çatlakların kapatılması, iç yüzeyin düzleştirilmesi ve kovanın iç sıcaklığının muhafaza edilmesinin yanı sıra kötü hava koşullarının önlenmesi (örneğin, soğuk havalarda çıkış açıklığının boyutunun düşürülmesi) ve arıların avcılardan korunması için kullanılır (Pasupuleti vd., 2017). Antimikrobiyel aktivitesi nedeniyle aseptik bir iç çevreye de katkıda bulunmakta ve çok büyük olan kovanları istila etmiş ölü böcek zararlılarının vücudunu kaplamak için kullanılmaktadır (Bonamigo vd., 2017a).

Ayrıca, kanserlerin tedavisi, nörodejeneratif, kardiyovasküler ve gastrointestinal sistem hastalıklarının yanı sıra yara ve yanıkların tedavisinde ajan olarak kullanımlarına ilgi artmıştır (Bazmandegan vd., 2017; Baltas vd., 2016). Arı ürünlerinin, birçok hastalığın patogenezinin altında yatan oksidatif stresin etkileriyle karşı karşıya gelebilecek potansiyel bir doğal antioksidan kaynağı olduğu düşünülmektedir. Genel olarak, serbest radikalleri temizleme yeteneğini ifade eden maddelere ait olan fenolik karaktere sahip bileşikler, arı ürünlerinin antioksidan kapasitelerinden esas olarak sorumludur (Kim vd., 2015; Florio vd., 2017). Fenolik bileşikler, flavonoidler ve fenolik asitler olmak üzere iki ana bileşik gruptan oluşurlar (Rzepecka-Stojko vd., 2015) Flavonoidler, flavonlar, flavonoller, flavanonlar flavanonoller, flavanoller (katesinler), antosiyaninler ve kalkonlar gibi çeşitli alt gruplar ve izoflavonlar ve neflavonoidler içeren polifenolik yapı bitki türevleridir (Arct ve Pytkowska, 2008; Panche vd., 2016). Flavonoidlerin moleküllerinde fenol gruplarının varlığı, onları süpürme sırasında oluşan radikallerin rezonansta stabilize olması nedeniyle onlara daha fazla antiradikal aktivite kazandırır (Arct ve Pytkowska, 2008). Yapılan araştırmalarda, yüksek miktarda biyoaktif bileşen

içerdiklerinden dolayı ham madde yerine propolis ve arı poleni özleri kullanılmıştır (Denisow ve Denisow-Pietrzyk, 2016). Bununla birlikte, farklı polaritelere sahip çözücüler kullanılmakta ve ekstrenin özellikleri sadece kullanılan çözücüye değil, aynı zamanda ekstraksiyon koşullarına, yani zamana ve sıcaklığa da bağlı olduğu bilinmektedir (Kim vd., 2015). Bu nedenle, günümüzde bu arı ürünü, ilaç ve gıda endüstrileri için büyük ilgi çekmektedir (Moreira vd., 2008). Farklı arı türlerinin ürettiği propolis, kimyasal bileşimlerini ve potansiyel farmakolojik aktivitelerini değerlendirmek için çalışmalar yapılmıştır (Valente vd., 2011; Ewnetu vd., 2013).

Nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kanser gibi sayısız hastalığın patogenezinin altında yatan oksidatif stresin etkilerini önleyebilen doğal maddeler ekosistemde bitkiler ve canlılar tarafından sentezlenebilmektedir. Bu çalışma doğal kaynaklardan takviye gıda almanın önemini göz önüne alarak, seçilen arı propolislerinin olası tıbbi uygulamalarındaki antioksidan kapasite bilgisinin mevcut durumunu güncellemeyi amaçlamaktadır. Buradan hareketle, bitki orijini, coğrafi konumu ve depolama süresi gibi etkilerin arı ürünlerindeki antioksidan mekanizmalara etkisine özel bir dikkat çekilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Üç farklı coğrafi bölgede bulunan Kafkas ırkı olarak bilinen *Apis Mellifera Caucasicus* cinsi bal arıları kolonilerinden 2018 yılında Haziran ayında propolis örnekleri alınmıştır (Çizelge 1). Örneklerin alındığı kovanların yerleri: Adıyaman İli Kâhta İlçesi (KH), Elazığ İli Sivrice İlçesi (SV) ve Tunceli İli Ovacık İlçesi (OV) olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada her bir bölgeden 6 örnek olmak üzere toplam 18 propolis örneği alınmıştır. Örnekler, Haziran ve Şubat aylarında çalışılmak üzere her bölge için üçer örnek olacak şekilde gruplara ayrılmıştır. Tanımlanan saha çalışmalarını için özel bir izin gerekmemiştir. Propolis örneklerini toplamak için yapılan tüm saha çalışmaları özel arazide ve mal sahibi izni ile yapılmıştır. Saha çalışmaları nesli tükenmekte olan veya korunan türleri içermemektedir. Bölge isimleri ve rakımları Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Bölge ve Rakımlar
Table 1. Region and Altitudes

Örnek alınan bölge <i>Sampled region</i>	Rakım (metre) <i>Altitude (meters)</i>
Ovacık (OV)	1300
Sivrice (SV)	1271
Kâhta (KH)	832

Propolis Örneklerinin Alınışı

Arı kovanlarından steril cam kavanozlara alınan propolisler laboratuvara getirilerek ekstraksiyon yapılarak kadar serin ve kuru bir yerde (1-2 °C, % 25 nispi rutubet) muhafaza edilmiştir (Kutlu, 2010). İki farklı mevsimde propolis örneklerinin MDA, vitamin (B1, B2, A ve E) ve DPPH analizleri yapılmak üzere çalışma gününe kadar uygun saklama koşullarında muhafaza edilmiştir. Önce 2018 Haziran ayında propolisler analize tabi tutulmuştur. Daha sonra oda koşullarında (25 °C) serin ve karanlık bir yerde muhafaza edilmiş diğer grup propolisler 2019 Şubat ayında analiz edilmiştir. Analiz sonuçları istatistiksel olarak hesaplanarak çizelgeler halinde verilmiştir.

Propolis Etanol Ekstraktının Hazırlanması (ExEP)

Propolisin etanol ekstreleri, % 80 etanol ile 4.5 g/mL oranında hazırlanmıştır. Bu çözelti, tamamen çözününceye kadar bir su banyosunda kapalı bir kap içinde 70 °C'de muhafaza edilerek ve daha sonra 80 g/m² filtre kağıdı üzerinde filtre edilmiştir (Alencar vd., 2007). Ekstreler hazırlandıktan sonra etiketlenerek karanlık yerde kapalı kaplarda saklanmış ve analize kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Kimyasal Analiz

HPLC Metoduyla Vitamin A ve E Analizi:

Numunelerden hazırlanan Propolis etanol ekstraktından (ExEP) 0,3 ml üzerine 0,3 mL %1' lik H₂SO₄ ihtiva eden etil alkolden ilave edilerek proteinler çöktürülmüştür. Karışım vortekslendikten sonra 2500 devirde 5 dakika santrifüjlenmiş ve örnekler üzerine 250 µL n-hegzan ilave edilmiştir. Hegzan ilavesiyle ortamdaki yağda çözünen vitaminler hegzan fazına ekstakte edilmiştir. Hegzan ilavesinden sonra tekrar vortekslenerek sonrasında tüpler santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda

hegzan fazı dikkatli bir şekilde ayrılarak cam tüpe alınmıştır. Örnek üzerine 250 µL n-hegzan ilave edilerek karıştırılıp santrifüj işleminden sonra n-hegzan fazı cam tüpteki hegzan fazı ile birleştirilmiştir. Ekstrakte edilen hegzan, kuru azot altında dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Kalıntı 100 µL metanolde çözülerek Shimadzu marka HPLC cihazında analiz edilmiştir. Örneklerdeki E vitamini 296 nm ve A vitamini 326 nm dalga boyunda inertsil 5µ C-18 (15 cm x 4.6 mm) kolonu ve asetonitril: metanol: diklorometan: kloroform: hegzan (60:10:15:10:5) hareketli fazında akış hızı 1mL/dk olacak şekilde UV-VIS dedektörü / fotodiyot dizi dedektörü ile üçer tekrar yapılarak analizlenmiştir (Catignani, 1983; Henning vd., 1997).

HPLC Metoduyla Vitamin B1 ve B2 Analizi

1mL propolis etanol ekstraktı (ExEP) üzerine 0.5 mL 0.5 M HClO₄ ilave edilerek vortekslenmiş ve daha sonra 2 ml saf su eklenmiştir. Karışım yaklaşık 10 dakika ultrasonik su banyosunda bekletildikten sonra 4500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek örneklerin üzerindeki berrak kısımdan dikkatlice 20µL alınmış ve Shimadzu marka HPLC cihazında mobil faz 5 mM heptano sülfonik asitin sodyum tuzu metanolde çözülmüştür, ardından % 0.1 trietilamin içeren 750 ml' lik çözeltisi ile 25:75 hacim oranında karıştırılarak pH'ı 2.8 olacak şekilde fosforik asit yardımıyla ayarlanmıştır. Mobil fazın akış hızı 0.7 mL/dk'da C18-DB kolon (15 cm (uzunluk) x 4.6 mm (iç çapı) x 5 µm (partikül büyüklüğü)' un da UV-VIS dedektörü / fotodiyot dizi dedektörü ile üçer tekrar yapılarak B1 ve B2 vitamini 260 nm dalga boyunda tayin edilmiştir (Amidzic vd., 2005; Markopoulou vd., 2002).

HPLC Metoduyla MDA Analizi:

Propolis etanol ekstraktından (ExEP) 1mL alınarak 1 mL suyla 1:1 (v/v) oranında fraksiyonlanmış ve çözünen fraksiyon HPLC cihazı ile analiz edilmiştir. Propolis ekstraktından 1ml alınarak üzerine 0.5 mL 0.5 M HClO₄ ilave edilmiş ve bu karışım vortekslendikten sonra üzerine 4.5 mL saf su eklenmiştir. Karışım 4500 devirde 5 dakika santrifüjlendikten sonra örneklerin üzerindeki berrak kısımdan dikkatlice 20µL alınarak MDA (Karatas vd., 2002) HPLC

'de analiz edilmiştir. Analizler Shimadzu marka HPLC cihazı ile ortam sıcaklığında hareketli faz olarak KH₂PO₄ - metanol (% 82.5 – 17.5; pH: 4) karışımında (SPD-M20A, RID-20A) pompa yardımıyla UV- Flurosans absorbands dedektörü ile 250 nm'de inertsil 5µ C-18 (15 cm x 4.6 mm) kolonu kullanılarak ve üçer tekrar yapılarak akış hızı 1 mL/dk olacak şekilde analiz edilmiştir.

Serbest Radikal Temizleme Etkinliği

DPPH serbest radikalının temizleme aktivitesine dayanarak ekstraktların serbest radikal temizleme aktivitesi analiz edilmiştir (Braca vd., 2001). Propolis özü (0.1 mL), 1 mL 250 µmol/L DPPH metanol çözeltisine ilave edilmiştir. 30 dakika inkübasyondan sonra serbest radikal DPPH'nin azalması, bir spektrofotometre (Lambda 25 UV / Görüntü Sistemleri-PerkinElmer, Washington-ABD) ile numune yerine etanol kullanılarak boş bir köre karşı 517 nm'de absorbands ve yüzde inhibisyon aktivitesi, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% I = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

A_0 : Kontrol absorbandsı

A_1 : Ekstrakt/standart absorbandsı

DPPH süpürme aktivitesi, DPPH emilimini % 50 azaltmak için gerekli olan numunenin konsantrasyonu olarak ifade edilir (IC₅₀). Bu çalışmada ekstrenin antioksidan kapasitesi, bir IC₅₀ değeri olarak ifade edilmiştir. IC₅₀ değeri, DPPH radikallerinin oluşumunu % 50 önleyen ekstrelerin konsantrasyonu (mg/L) olarak tanımlanmıştır. Tüm testler üç kopya halinde yapılmış ve sonuçlar üç gözlemin ortalamasıyla verilmiştir. Düşük IC₅₀ değerleri daha yüksek radikal temizleme aktivitesine işaret eder.

İstatistiksel Analiz

İncelenen parametrelerin istatistik farklılıkları SPSS 15.0 istatistik programıyla ortalama ve standart sapma kullanılarak bulunmuştur. Bu çalışmada iki bağımsız (Haziran-Şubat) grubun dağılımlarının istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını saptayıp ikili (dichotomous) bağımsız karşılaştırma için Mann Whitney-U testi kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama±standart sapma

ve $P < 0.05$ anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada üç farklı bölgeden toplanan kahverengi propolis numunelerinin hem serbest radikal temizleyici aktivitede hem de lipid peroksidasyonunu önleme kabiliyetinde farklı bileşimde farklı sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Elde edilen *in vitro* verilerde B1 ve B2 suda eriyen vitaminler ve antioksidan belirteçler arasında olan vitamin A ve E düzeylerinde yükseltilere çıkıldıkça artan değerler tespit edilmiştir. Ayrıca DPPH (düşük IC₅₀) ve lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerinin ise yüksek rakımlara çıkıldıkça azaldığı gözlemlenmiştir (Çizelge 2).

DPPH düzeylerine bakıldığında; Ovacık bölgesi propolisinin Haziran ayında (95.42±1.22 mg/L) elde edilen analiz sonuçlarının en düşük IC₅₀ düzeylerinde olduğu ve Kâhta bölgesi Şubat ayında (368.22±4.31 mg/L) elde edilen analiz sonuçlarının ise en yüksek IC₅₀ değerinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1). Bölgesel olarak kıyaslama yapıldığında depolama başlangıcında (Haziran) DPPH düzeyleri Kâhta, Sivrice ve Ovacık bölgeleri için sırasıyla 168.47±2.33, 130.88±2.28 ve 95.42±1.22 mg/L olarak tespit edilirken, depolama sonrasında (Şubat) bu değerlerin sırasıyla 368.22±4.31, 259.79±2.42 ve 140.11±2.29 mg/L seviyelerine yükseldiği belirlenmiştir (Çizelge 2). Bölgesellik etkisine dayanan verilerin $P < 0.05$ anlamlılık düzeyinde farklı olduğu gözlemlenmiştir.

MDA düzeylerine bakıldığında; Ovacık bölgesinde, Haziran ayında (0.381±0.020 nmol/mL) elde edilen analiz sonuçlarının en düşük MDA düzeylerinde olduğu ve Kâhta bölgesi Şubat (1.419±0.023 nmol/mL) ayında elde edilen analiz sonuçlarının ise en yüksek MDA düzeylerinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2). Bölgesel olarak kıyaslama yapıldığında depolama başlangıcında (Haziran) MDA düzeyleri Kâhta, Sivrice ve Ovacık bölgeleri için sırasıyla 1.181±0.095, 0.608±0.065, 0.381±0.020 nmol/mL olarak tespit edilirken, depolama sonrasında (Şubat) bu değerlerin sırasıyla

1.419±0.023, 0.927±0.054, 0.552±0.031 nmol/mL seviyelerine yükseldiği belirlenmiştir (*Çizelge 2*). Bölgesellik etkisine dayanan verilerin $P < 0.05$ anlamlılık düzeyinde farklı olduğu gözlemlenmiştir.

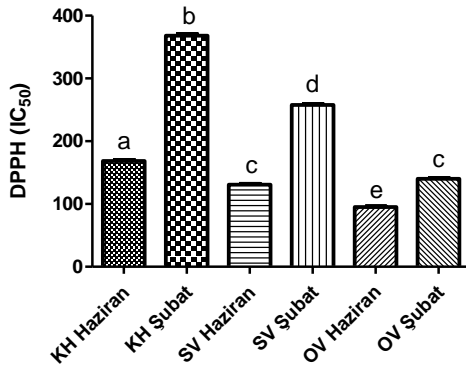
Çizelge 2. Propolisin Oksidan- Antioksidan Analiz Verileri.

Table 2. Propolis Oxidant-Antioxidant Analysis Data.

Numuneler <i>Samples</i>	DPPH (IC ₅₀) (mg/L)	MDA (nmol/mL)	Vit.B1 (µg/g)	Vit.B2 (µg/g)	Vit.A (µg/g)	Vit.E. (µg/g)
KH Haziran <i>KH June</i>	168.47±2.33 ^a	1.181±0.095 ^a	44.24±5.04 ^a	88.23±4.46 ^a	6.65±0.29 ^a	18.45±1.25 ^a
KH Şubat <i>KH February</i>	368.22±4.31 ^b	1.419±0.023 ^b	36.56±4.03 ^b	66.13±2.44 ^b	3.58±0.09 ^b	15.88±1.38 ^b
SV Haziran <i>SV June</i>	130.88±2.28 ^c	0.608±0.065 ^c	61.12±6.14 ^c	101.04±3.82 ^c	10.51±0.11 ^c	26.44±1.21 ^c
SV Şubat <i>SV February</i>	259.79±2.42 ^d	0.927±0.054 ^d	52.48±5.52 ^d	87.48±5.17 ^a	7.12±0.18 ^a	23.18±1.22 ^d
OV Haziran <i>OV June</i>	95.42±1.22 ^e	0.381±0.020 ^e	64.48±5.12 ^c	104.42±3.85 ^c	17.44±0.25 ^d	38.64±2.75 ^e
OV Şubat <i>OV February</i>	140.11±2.29 ^e	0.552±0.031 ^c	53.15±3.89 ^d	101.46±3.37 ^c	13.48±0.31 ^e	33.24±2.25 ^f

Bu tabloda gösterilen veriler 3 tekrarlı olarak temin edilen numunelerde yapılan ölçümlerin ortalama±standart sapma değerleridir. Satırlardaki farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları temsil etmektedir ($P < 0.05$). *Data presented in this table consist of average values±standard deviation of 3 batches. Different letters in the rows represent statistically significant differences (P < 0.05).*

KH; Kâhta, SV; Sivrice, OV; Ovacık



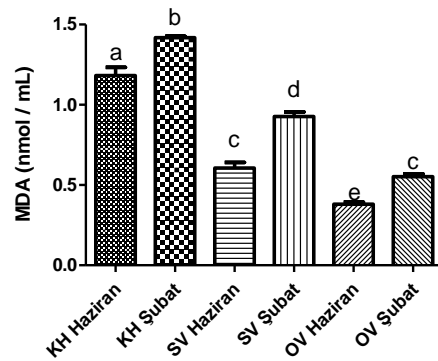
Şekil 1. DPPH analiz grafiği

Figure 1. DPPH analysis graph

Farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları temsil etmektedir ($P < 0.05$).

Different letters are statistically significant represent differences (P < 0.05).

KH; Kâhta, SV; Sivrice, OV; Ovacık



Şekil 2. MDA analiz grafiği

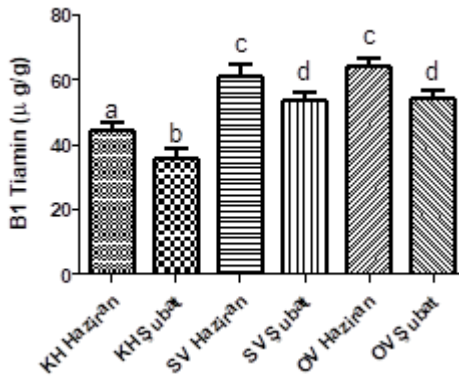
Figure 2. MDA analysis graph

Farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları temsil etmektedir ($P < 0.05$).

Different letters are statistically significant represent differences (P < 0.05).

KH; Kâhta, SV; Sivrice, OV; Ovacık

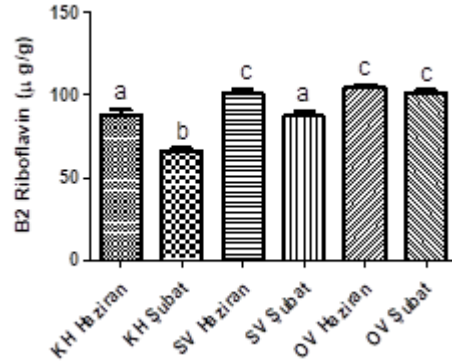
Vitamin B1 düzeylerine bakıldığında; Ovacık bölgesinde, Haziran ayında elde edilen verilerin en yüksek vitamin B1 ($64.48 \pm 5.12 \mu\text{g/g}$) düzeylerinde olduğu ve Kâhta bölgesi Şubat ayında elde edilen verilerde ise en düşük vitamin B1 ($36.56 \pm 4.03 \mu\text{g/g}$) düzeyinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3). Bölgesel olarak kıyaslama yapıldığında, depolama başlangıcında (Haziran) vitamin B1 düzeyleri Kâhta, Sivrice ve Ovacık bölgeleri için sırasıyla 44.24 ± 5.04 , 61.12 ± 6.14 , $64.48 \pm 5.12 \mu\text{g/g}$ olarak tespit edilirken, depolama sonrasında (Şubat) bu değerlerin sırasıyla 36.56 ± 4.03 , 52.48 ± 5.52 , $53.15 \pm 3.89 \mu\text{g/g}$ seviyelerine düştüğü belirlenmiştir (Çizelge 2). Bölgesellik etkisine dayanan verilerin $P < 0.05$ anlamlılık düzeyinde farklı olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3. B1 vitamini analiz grafiği
Figure 3. Graph of analysis of vitamin B1
Farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları temsil etmektedir ($P < 0.05$).
Different letters are statistically significant represent differences ($P < 0.05$).
KH; Kâhta, SV; Sivrice, OV; Ovacık

Vitamin B2 düzeylerine bakıldığında; Ovacık bölgesinde, Haziran ayında elde edilen verilerin en yüksek vitamin B2 ($104.42 \pm 3.85 \mu\text{g/g}$) düzeylerinde olduğu ve Kâhta bölgesi Şubat ayında elde edilen verilerde ise en düşük vitamin B2 ($66.13 \pm 2.44 \mu\text{g/g}$) düzeyinde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4). Bölgesel olarak kıyaslama yapıldığında, depolama başlangıcında (Haziran) vitamin B2 düzeyleri Kâhta, Sivrice ve Ovacık bölgeleri için sırasıyla 88.23 ± 4.46 , 101.04 ± 3.82 , $104.42 \pm 3.85 \mu\text{g/g}$ olarak tespit edilirken,

depolama sonrasında (Şubat) bu değerlerin sırasıyla 66.13 ± 2.44 , 87.48 ± 5.17 , $101.46 \pm 3.37 \mu\text{g/g}$ seviyelerine düştüğü belirlenmiştir (Çizelge 2). Bölgesellik etkisine dayanan verilerin $P < 0.05$ anlamlılık düzeyinde farklı olduğu gözlemlenmiştir.

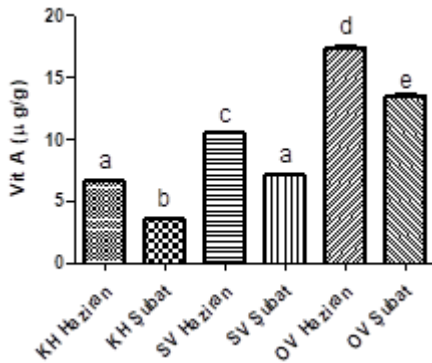


Şekil 4. B2 vitamini analiz grafiği
Figure 4. Graph of analysis of vitamin B2
Farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları temsil etmektedir ($P < 0.05$).
Different letters are statistically significant represent differences ($P < 0.05$).
KH; Kâhta, SV; Sivrice, OV; Ovacık

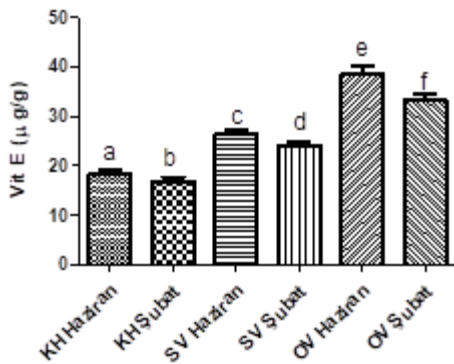
Vitamin A düzeylerine bakıldığında; Ovacık bölgesinde vitamin A düzeylerinin, Haziran ayında yapılan analiz sonuçlarında depolama sonrasında (Şubat) yapılan analiz sonuçlarına kıyasla en yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5). Bölgesel olarak kıyaslama yapıldığında, depolama başlangıcında (Haziran) vitamin A düzeyleri Kâhta, Sivrice ve Ovacık bölgeleri için sırasıyla 6.65 ± 0.29 , 10.51 ± 0.11 , $17.44 \pm 0.25 \mu\text{g/g}$ olarak tespit edilirken, depolama sonrasında (Şubat) bu değerlerin sırasıyla 3.58 ± 0.09 , 7.12 ± 0.18 , $13.48 \pm 0.31 \mu\text{g/g}$ seviyelerine düştüğü belirlenmiştir (Çizelge 2). Bölgesellik etkisine dayanan verilerin $P < 0.05$ anlamlılık düzeyinde farklı olduğu gözlemlenmiştir.

Vitamin E düzeylerine bakıldığında; Ovacık bölgesinde vitamin E düzeylerinin, Haziran ayında yapılan analiz sonuçlarında depolama sonrasında (Şubat) yapılan analiz sonuçlarına kıyasla en yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6). Bölgesel olarak kıyaslama yapıldığında,

depolama başlangıcında (Haziran) vitamin E düzeyleri Kâhta, Sivrice ve Ovacık bölgeleri için sırasıyla 18.45 ± 1.25 , 26.44 ± 1.21 , 38.64 ± 2.75 $\mu\text{g/g}$ olarak tespit edilirken, depolama sonrasında (Şubat) bu değerlerin sırasıyla 15.88 ± 1.38 , 23.18 ± 1.22 , 33.24 ± 2.25 $\mu\text{g/g}$ seviyelerine düştüğü belirlenmiştir (Çizelge 2). Bölgesellik etkisine dayanan verilerin $P < 0.05$ anlamlılık düzeyinde farklı olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 5. A vitamini analiz grafiği
Figure 5. Graph of vitamin A analysis
Farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları temsil etmektedir ($P < 0.05$).
Different letters are statistically significant represent differences ($P < 0.05$).
KH; Kâhta, SV; Sivrice, OV; Ovacık



Şekil 6. E vitamini analiz grafiği
Figure 6. Graph of vitamin E analysis
Farklı harfler istatistiksel olarak önemli farklılıkları temsil etmektedir ($P < 0.05$).
Different letters are statistically significant represent differences ($P < 0.05$).
KH; Kâhta, SV; Sivrice, OV; Ovacık

Calegari ve arkadaşları sırasıyla, mart ve nisan aylarında üretilen propolis örneklerinin renklerinde ve toplam fenolik bileşiklerin yanı sıra antioksidan kapasitelerinin ve propolisin kimyasal bileşiminin farklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir (Calegari vd., 2017). Bu çalışmada da antioksidan belirteç olan vitamin düzeylerinin Haziran ayında analiz edilen propolis örneklerinde, depolama sonrasında (Şubat) analiz edilen örneklere göre daha yüksek düzeylerde olması üretim ayındaki ve saklama sıcaklıklarındaki ortam değişiklikleri ile açıklanabilir.

Doğal olarak, vücutta üretilen serbest radikallerin miktarı ile onları gideren veya temizleyen ve vücudu zararlı etkilerine karşı koruyan antioksidan savunma sistemi arasında dinamik bir denge vardır. Antioksidan vitaminler, immün uyarılma, serbest radikalleri temizleme ve kanserojenlerin metabolik aktivasyonunda değişiklik yapma gibi biyolojik aktivitelere sahiptir (Geert ve Henk, 1997). Bu metabolitler biyopolimerleri koruyarak reaktif oksijen türlerini ve oksidatif DNA hasarını azaltabilir (Halliwell, 1996). Brezilya'dan toplanan beş farklı propolis örneğinin antioksidatif aktivitesi ksantin / ksantin oksidaz (XOD), DPPH ve süperoksit anyon radikali temizleme aktiviteleri karşılaştırıldığında, hem DPPH serbest radikali hem de süperoksit anyonlarına karşı güçlü antioksidan etkiler gösterdiği söylenmektedir (Arjun vd., 2001). Bu bileşiklerin, C vitamini, E vitamini ve kafeik asit gibi en sık kullanılan antioksidanlardan daha güçlü serbest radikal temizleme etkinliği gösterdiği bildirilmiştir (Arjun vd., 2001). Propolis DPPH, ABTS + , FRAP ve ORAC yöntemleri kullanılarak tam olarak araştırılmıştır ve antioksidan özellikleri bilinmektedir (Zhang vd., 2017; Betances-Salcedo vd., 2017). Bir *in vitro* çalışmada, propolis ekstraktının antioksidan kapasitesinin, sentetik antioksidan BHT veya askorbik asidin özelliklerine benzer olduğu tespit edilmiştir (Bonamigo vd., 2017b). Propolis özütlerinin toplam fenolik içeriği yaklaşık 30 ila 200 mg gallik asit eşdeğeri (GAE) / g kuru ağırlık ve flavonoid içeriği yaklaşık 30 ila 70 mg quercetin eşdeğeri arasındadır (QE) / g, DPPH serbest radikal giderme faaliyeti ise yaklaşık 20 ila 190 $\mu\text{gr} / \text{mL}$ arasında değişmektedir (Zhang vd., 2017). Başka

bir çalışmada 3,4,5-trikaffeoilkinik asit, 3,5-dikaffeoilkinik asit, 4,5-dikaffeoilkinik asit ve artepilin C'nin Brezilya yeşil propolisinin güçlü antioksidan aktivitesinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Zhang vd., 2017). Kavak ağacı kaynaklı propolis antioksidan aktivitesinin, hem toplam polifenol hem de toplam flavonoid içeriğinden büyük ölçüde farklı olduğu da söylenmektedir (Socha vd., 2014). Fabris ve arkadaşları Avrupa propolis örneklerinin benzer polifenolik bileşime ve dolayısıyla benzer antioksidan aktiviteye sahip olduğunu, ancak güney Amerika propolisinin daha düşük polifenolik miktar ile daha düşük antioksidan özelliklere sahip olduğunu söylemişlerdir (Fabris vd., 2013). Genel olarak, propolis kompozisyonunun standardizasyonunda çeşitli tutarsızlıkların olduğu görülmektedir. Bu durum, arı türleri, bitki orijini, coğrafi konum, sıcaklık değişimi, saklama koşulları ve depolama süresi gibi pek çok faktöre bağlı olmasından kaynaklanmaktadır (Calegari vd., 2017). Yapılan bir çalışmada arı türlerine, *Scaptotrigona depilis*, *Melipona quadrifasciata anthidioides*, *Plebeiadroriana* ve *Apis mellifera*'ya ait aynı bölgeden toplanan propolis örneklerinin etanol ekstraktının antioksidan aktivitesi incelenmiş ve *Apis mellifera* dan elde edilen propolis en yüksek etkinliğe sahip olduğu söylenmiştir (Bonamigo vd., 2017b). Ayrıca, yıl boyunca besin takviyesi alan arı kolonilerinin, bu takviyeden daha yüksek toplam fenolik ve flavonoid içeriği ve antioksidan kapasiteye sahip oldukları da bildirilmiştir (Calegari vd., 2017).

Propolis ekstrelerinin hem kimyasal bileşimi hem de biyolojik özellikleri, özütleme için kullanılan çözücülerin tipine büyük ölçüde bağlıdır (Narimane vd., 2017). Propolisin ekstraksiyonu için en yaygın kullanılan çözücü sulu etanoldür (özellikle % 70-80 konsantrasyonda), bunu etil eter, su, metanol, heksan ve kloroform gibi diğer çözücüler takip eder (Sun vd., 2015). % 75 etanol ekstraktı ayrıca DPPH, ABTS, FRAP, oksijen radikal emme kapasitesi (ORAC) ve hücre antioksidan aktivite (CAA) yöntemleriyle ölçülen en yüksek antioksidan kapasiteyi göstermiştir (Bittencourt vd., 2015). Bu çalışmada da en iyi antioksidan kapasiteyi tespit etmek için %80

etanol ekstresi kullanılmıştır. Diklorometan ile ayrılmanın, özellikle kahverengi propolis antioksidan bileşiklerinin ekstraksiyonunu arttırdığını, heksan ile ayrılmanın ise yeşil propolis ekstraktındaki miktarlarını önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (Ferreira vd., 2013).

Bileşimindeki sayısız farklılıklara rağmen, propolis özü her zaman antioksidan özelliklere sahiptir. Propolis sulu ekstraktlarının bile hücre kültüründe ve hayvan çalışmalarında antioksidan kapasiteye sahip oldukları gösterilmiştir (Ferreira vd., 2013). Bu durum, belirli arı ürün numunelerinin farklı bileşimlere sahip olmasından kaynaklanabilir. Bu nedenle detaylı bir kimyasal analiz olmadan potansiyel terapötik uygulamaları ile ilgili genel bir sonuç çıkarmak zordur. Bununla birlikte, propolis kimyasal bileşimi botanik kökeni, sıcaklık değişimi ve depolama süresi gibi faktörlerin yanı sıra arılar tarafından propolise eklenmiş tükürük salgıları ve enzimler gibi faktörlere de bağlıdır (Bankova vd., 2014; Salatino vd., 2005).

Bu çalışmada da benzer şekilde üç farklı bölge propolisinin botanik kökeni, sıcaklık değişimi ve depolama süresi gibi faktörlerin etkisiyle farklı antioksidan özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Yüksek rakımda olan Ovacık bölgesi propolisi, yüksek vitamin düzeyleri, düşük DPPH ve MDA düzeyleri ile bu öngörüye desteklemektedir. Bu farklılığın propolisin terapötik özelliklerini değiştirerek, bileşikler kalitatif ve kantitatif olarak değiştirebileceği söylenmektedir (Huang vd., 2014). Böylece, aynı bölgede birlikte yaşayan farklı arı türleri tarafından üretilen propolis farklı biyolojik maddeler ve aktiviteler sunabilir. Türkiye'de propolis ile yapılan çalışmalarda, bölgesel karşılaştırmalara rastlanmasa bile dünyanın farklı bölgelerinden gelen propolis antioksidan (Kumazawa vd., 2004), antibiyofilm (Ong vd., 2017), antimikrobiyal (Campos vd., 2015), antienflamatuar (Funakoshi-Tago vd., 2015) ve antitümör (Lopez vd., 2015) aktivitelerine sahip olduğu bildirilmiştir. Dolayısı ile farklı bölgelerde farklı iklim koşulları, bitki örtüsü, sıcaklık ve nem gibi etkenler aynı ırk arılarda bile farklı propolis kimyasal bileşimini gösterdiği tespit edilmiştir.

SONUÇ

Propolis çoğunlukla, antioksidan özelliklere sahip olduğu bilinen flavonoidler ve fenolik bileşiklerden oluşmaktadır. Antioksidatif etki nedeniyle, propolis insanları zararlı oksidatif işlemlerden koruyabilir. Bu çalışmada Haziran ayında taze analiz edilen ve yaklaşık sekiz aylık bir depolama süresi sonrasında (Şubat) analiz edilen propolisin lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerinde artış tespit edilmiştir. Uzun süre raf ömrünün bozulmalara yol açarak radikal süpürme aktivitesini azalttığı ve bununla birlikte vitamin düzeylerinde azalma ile seyrettiği tespit edilmiştir. Ayrıca, yükseklere çıkıldıkça nem, bitki örtüsü, sıcaklık gibi değişimler sonucunda içeriğindeki farklı flavonoidler ve fenolik bileşiklerden kaynaklanan antioksidatif kapasitesini koruduğu ve arttırdığı tespit edilmiştir. *Apis Mellifera Caucasicus* cinsi bal arıları kolonilerinden elde edilmiş kahverengi propolisin oksidatif strese bağlı bozuklukların veya insandaki hastalıkların tedavisinde umut verici takviye bir gıda olabileceğini söylemek mümkündür. Bu çalışmadan elde edilen veriler ile Türkiye propolisinin antioksidan özellikleri bakımından karşılaştırılmasının literatüre katkı sağlayacağı ve ileride yapılması düşünülen çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Alencar, S.M., Oldoni, T.L.C., Castro, M.L., Cabral, I.S.R., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J Ethnopharmacol*, 113: 278–283. doi: 10.1016/j.jep.2007.06.005

Amidzic, R., Brboric, J., Cudina, O., Vladimirov, S. (2005). RP-HPLC Determination of vitamins B1, B3, B6, folic acid and B12 in multivitamin tablets, *J Serb Chem Soc*,70(10), 1229–1235.

Arct, J., Pytkowska, K. (2008). Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. *Clin Dermatol*, 26(4):347–357. doi: 10.1016.01.004.

Baltas, N., Karaoglu, S. A., Tarakci, C., Kolayli, S. (2016). Effect of propolis in gastric disorders: inhibition studies on the growth of helicobacter pylori and production of its urease. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31(sup2):46-50. Epub 2016 May 27.

Arjun, H., Yasuhiro, T., Shigetoshi, K. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res*, 15, 561–571

Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol*, 100: 114–117. doi: 10.1016/j.jep.2005.05.004

Bankova, V., Popova, M., Trusheva, B. (2014). Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chem Cent J*, 8(28): 1–8. doi: 10.1186/1752-153X-8-28

Bazmandegan, G., Boroushaki, M. T., Shamsizadeh, A., Ayoobi, F., Hakimzadeh, E., Allahtavakoli, M. (2017). Brown propolis attenuates cerebral ischemia-induced oxidative damage via affecting antioxidant enzyme system in mice. *Biomed Pharmacother*, 85:503–510. doi: 10.1016/ 2016.11.057.

Betances-Salcedo, E., Revilla, I., Vivar-Quintana, A. M., González-Martín, M. I. (2017). Flavonoid and antioxidant capacity of propolis prediction using near infrared spectroscopy. *Sensors (Basel)*, Jul 18;17(7). pii: E1647. doi: 10.3390/s17071647.

Bittencourt, M. L. F., Ribeiro, P. R., Franco, R. L. P., Hilhorst, H. W. M., Castro, R. D., Fernandez, L. G. (2015). Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. *Food Res Int*, Oct;76(Pt3): 449-457. doi: 10.1016/j.foodres.2015.07.008. Epub 2015 Jul 14.

Bonamigo, T., Campos, J. F., Alfredo. T. M. (2017a). Antioxidant, cytotoxic, and toxic activities of propolis from two native bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *melipona quadrifasciata anthidioides*. *Oxid Med Cell Long*, 2017;2017:1038153. doi: 10.1155/2017/1038153. Epub 2017 Mar 9.

Bonamigo, T., Campos, J. F., Oliveira, A. S. (2017b). Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of *Plebeia droryana* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian cerrado biome. *J Pone*, 12(9, article e0183983) doi: 10.1371/.0183983.

- Braca, A., Nunziatina, D., Lorenzo, D. B., Cosimo, P., Mateo, P. (2001). Antioxidant principles from baehinia terapotensis. *J Nat Prod*, 64, 892–895.
- Calegari, M. A., Prasniewski, A., Silva, C. D. (2017). Propolis from Southwest of Parana produced by selected bees: influence of seasonality and food supplementation on antioxidant activity and phenolic profile. *An Acad Bras Cienc*, 2017 Jan-Mar;89(1):45-55. doi: 10.1590/0001-3765201620160499. Epub 2017 Feb 6.
- Campos, J.F., Santos, U.P., Rocha, P.S., Damião, M.J., Balestieri, J.B.P., Cardoso, C.A.L. (2015). Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *tetragonisca fiebrigi* (jataí). *Evid-Based Comp Alternative Med*, 2015: 1–11. doi: 10.1155/2015/296186
- Catignani, G.L. (1983). Simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in serum of plasma by liquid chromatography. *Clin Chem*, 29(14), 708-712.
- Denisow B., Denisow-Pietrzyk, M. (2016). Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *J Sci Food Agric*, 96(13):4303–4309. doi: 10.1002.7729
- Ewnetu, Y., Lemma, N., Birhane, W. (2013). Antibacterial effects of *Apis mellifera* and stingless bees honeys on susceptible and resistant strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* in Gondar, northwest Ethiopia. *Comp Alternative Med*, 13(269): 2–7. doi: 10.1186/1472-6882-13-269
- Fabris, S., Bertelle, M., Astafyeva, O. (2013). Antioxidant properties and chemical composition relationship of European and Brazilian propolis. *Pharmacol Pharm*, 4(1):46–51. doi: 10.4236/pp.2013.41006.
- Ferreira, D., Rocha, H. C., Kreutz, L. C. (2013). Bee products prevent agricultural-induced oxidative damage in fish. *J Pone*, 8(10, article e74499) doi: 10.1371/.0074499.
- Florio, Almeida J., Reis, A. S., Heldt, L. F. S. (2017). Lyophilized bee pollen extract: a natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages. *LWT - Food Sci Technol*, 76:299–305. doi: 10.1016/ 2016.06.017.
- Funakoshi-Tago, M., Okamoto, K., Izumi, R., Tago, K., Yanagisawa, K., Narukawa, Y. (2015). Anti-inflammatory activity of flavonoids in nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway. *Int Immunopharmacol*, 25: 189–198. doi: 10.1016/j.intimp.2015.01.012
- Geert V. P., Henk V. B. (1997). Vitamins and cancer. *Cancer Letters*, 114, 195-202.
- Halliwell, B. (1996). Vitamin C: Antioxidant or pro-oxidant in vivo. *Free Radic Res*, Volume 25, Issue 5, Pages 439-454
- Henning, S.M., Swendseid, M.E., Ivandic, B.T., Liao, F. (1997). Vitamins C, E and A and hemre oxygenase in rats fed methyl/folate-deficient diets, *Free Radic. Biol Med*, 23(6):936-42.
- Huang, S., Zhang, C.P., Wang, K., Li, G.L., Hu, F.L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Mol*, 19: 19610–19632. doi: 10.3390/molecules191219610
- Karatas, F., Karatepe, M., Baysar, A. (2002). Determination of free malondialdehyde in human serum by high performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 311: 76-79.
- Kim, S. B., Jo, Y. H., Liu, Q. (2015). Optimization of extraction condition of bee pollen using response surface methodology: correlation between anti-melanogenesis, antioxidant activity, and phenolic content. *Mol*, 20(11):19764–19774. doi: 10.3390/201119656.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem*, 84: 329–339. doi: 10.1016/S0308-8146(03)00216-4
- Kutlu, M.A. (2010). Organik Bal Üreticisinin El Kitabı, Genç ilçesi - Bingöl, 77-78s.
- Lopez, A.G.C, Lourenço, C.C., Alvesa, D.A., Machado, D., Lancellottia, M., Sawaya, C.H.F. (2015). Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert as to its safe use. *J Appl Microbiol* 119(3): 677–687. doi: 10.1111/jam.12874

- Markopoulou, C. K., Kagkadis, K. A., Koundourellis, J. E. (2002). An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B1, B6, B12, in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*, 30, 1403- 1410.
- Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, J.A., Estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food Chem Toxicol*, 46: 3482–3485. doi: 10.1016/j.fct.2008.08.025
- Narimane, S., Demircan, E., Salah, A., Ozcelik, B. O., Salah, R. (2017). Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of Algerian propolis: influence of solvent. *Pak J Pharm Sci*. 2017 Jul;30(4(Suppl.)):1417-1423.
- Ong, T.H., Chitra, E., Ramamurthy, S., Siddalingam, R.P., Yuen, K.H., Ambu, S.P. (2017). Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Plos one*, 12(3): 1–22. doi: 10.1371/journal.pone.0174888
- Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*, 5:p. e47. doi: 10.1017.41.
- Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., Gan, S. H. (2017). Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxid Med Cell Long*. 2017;2017:1259510. doi: 10.1155/2017/1259510. Epub 2017 Jul 26.
- Rzepecka-Stojko, A., Stojko, J., Kurek-Górecka, A. (2015). Polyphenols from bee pollen: structure, absorption, metabolism and biological activity. *Mol*, 20(12):21732–21749. doi: 10.3390.
- Salatino, A, Teixeira, E.W., Negri, G., Message, D. (2005). origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evid-Based Comp Alternative Med*, 2(1): 33–38. doi: 10.1093/ecam/neh060
- Socha, R., Galkowska, D., Bugaj, M., Juszcak, L. (2014). Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Nat Prod Res*. 2015;29(5):416-22. doi: 10.1080/14786419.2014.949705.
- Sun, C., Wu, Z., Wang, Z., Zhang, H. (2015). Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. *Evid-Based Comp Alternative Med*, 2015;2015:595393. doi: 10.1155/2015/595393.
- Valente, M.J., Baltazar, A.F., Henrique, R., Estevinho, L., Carvalho, M. (2011). Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth *in vitro*. *Food Chem Toxicol*, 49: 86–92. doi: 10.1016/j.fct.2010.10.001
- Zhang, C., Shen, X., Chen, J., Jiang, X., Hu, F. (2017). Identification of free radical scavengers from Brazilian green propolis using off-line HPLC-DPPH assay and LC-MS. *J Food Sci*, Jul;82(7):1602-1607. doi: 10.1111/1750-3841.13730.