Kemijski sastav i biološka aktivnost meda manuke

Pravdić, Mirna

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:562345

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Mirna Pravdić

KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST MEDA MANUKE

Diplomski rad

Akademska godina:
2016./2017.

Mentor:
prof. dr. sc. Igor Jerković

Split, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Mirna Pravdić

KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST MEDA MANUKE

Diplomski rad

Akademska godina:
2016./2017.

Mentor:
prof. dr. sc. Igor Jerković

Split, rujan 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet:
Tema rada je prihvaćena u prosincu 2016. na sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: prof. dr. sc. Igor Jerković
Pomoć pri izradi:

KEMIJSKI SASTAV I BIOLOŠKA AKTIVNOST MEDA MANUKE

Mirna Pravdić, broj indeksa: 72

Sažetak:

Prvi registrirani „medicinski med“ i danas jedan od najistraživanijih vrsta meda je manuka med. To je tamni, monoflorni med dobiven iz manuka biljke, *Leptospermum scoparium*, koja raste kao grm ili stablo na Novom Zelandu i u istočnoj Australiji.

Fitokemikalije su tvari koje potječu iz biljaka s kojih pčele skupljaju nektar ili mednu rosu, a mogu povoljno utjecati na zdravlje čovjeka. Uspoređujući s drugim vrstama meda, manuka med sadrži najviše flavonoida i fenolnih kiselina koji djeluju kao antioksidansi te protuupalno, antiproliferativno i antimikrobno. Metilglioksal (MGO) je i do sto puta zastupljeniji u medu manuke, u usporedbi s drugim vrstama meda, te je odgovoran za njegov snažni antimikrobni učinak.

Manuka med ima razne biološke učinke i široku primjenu u komplementarnoj, ali i u konvencionalnoj medicini. Djeluje antimikrobno na široki spektar bakterija, uključujući i multirezistentne sojeve, zahvaljujući svojoj peroksidnoj i neperoksidnoj aktivnosti. Snažan je antioksidans, djeluje protuupalno, imunostimulacijski, citotoksično te kao antivirotik, antimikotik i antihelmintik. Najznačajnija je njegova primjena u tretiranju inficiranih rana i opekotina. Pozitivno djeluje na gastrointestinalni trakt, središnji živčani sustav, kod kardiovaskularnih bolesti i komplikacija dijabetesa. Dobar je u očuvanju oralnog zdravlja, brzi je izvor energije kod sportaša te vrijedna nutritivna tvar u dječjoj prehrani.

Ključne riječi: med, manuka, sastav, aktivnost

Rad sadrži: 98 stranica, 30 slika, 8 tablica, 0 priloga, 162 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Ani Radonić - predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Vesna Sokol - član
3. prof. dr. sc. Igor Jerković - član-mentor

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title:
Thesis subject was approved in December 2016 by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology and Faculty Council of School of Medicine
Mentor: Igor Jerković, PhD, full prof.
Technical assistence:

CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF MANUKA HONEY

Mirna Pravdić, index number: 72

Summary:

The first registered „medicinal honey“ and today one of the most researched honeys is manuka honey. It is a dark, monofloral honey obtained from the manuka plant, *Leptospermum scoparium*, which grows as a bush or tree in New Zealand and eastern Australia.

Phytochemicals are substances that originate from plants from which honey bees collect nectar or honeydew and they can benefit the human health. When comparing to other honeys, manuka honey contains the most flavonoids and phenolic acids which are antioxidants and act anti-inflammatory, antiproliferative and antimicrobial. Methylglyoxal (MGO) is about hundredfold more present in manuka honey than in other honeys and is crucial for his strong antimicrobial action.

Manuka honey exhibits various biological effects with an extensive application in complementary, but also in conventional medicine. It acts antimicrobial on a broad bacterial spectrum, including multiresistant strains, because of its peroxide and non-peroxide activity. It is a strog antioxidant, anti-inflammatory, imunostimulating, cytotoxic but also antiviral, antifungal and antihelmintic agent. The most significant indication of manuka honey is in wound and burns treatment. It exhibits benefitial impacts on gastrointestinal tract, central nervous sytem, cardiovascular health and in diabetics, has a positive effect on reducing complications. It can be used for maintaining oral health, is a fast source of energy in sports and is a valuable nutritious substance in child's diet.

Key words: honey, manuka, composition, activity

Thesis contains: 98 pages, 30 figures, 8 tables, 0 supplements, 162 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ani Radonić - PhD, associate prof. - chair person
2. Vesna Sokol - PhD, associate prof. - member
3. Igor Jerković - PhD, full prof. - supervisor

Defence date:

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Igoru Jerkoviću na organiziranosti te pomoći i korisnim savjetima u izradi diplomskog rada.

Hvala mojoj obitelji na širokogrudnosti, potpori i razumijevanju tijekom cjelokupnog obrazovanja.

Hvala Ivanu na izdvojenom vremenu, psihičkoj i tehničkoj potpori u izradi ovog diplomskog rada, kao i tijekom cijelog fakultetskog obrazovanja.

Hvala mojim prijateljima, kolegama u međusobnom podupiranju i druženju tijekom ovog petogodišnjeg procesa.

Diplomski rad je izrađen u sklopu istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost HRZZ-IP-11-2013-8547, "Research of Natural Products and Flavours: Chemical Fingerprinting and Unlocking the Potential".

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Povijest meda u medicini 2
1.2. Apiterapija 3
1.2.1. Pčelinji proizvodi 4
1.2.2. Definiranje meda 7
1.2.3. Vrste meda 7
1.3. Manuka med 10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 11
3. MATERIJALI I METODE 13
3.1. Metode određivanja botaničkog i zemljopisnog podrijetla meda 14
3.1.1. Klasične metode 14
3.1.2. Suvremene metode 16
3.1.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) 17
3.1.2.2. Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS) 18
3.2. Fluorescencijska spektrometrija (fluorimetrija) 19
3.3. Metode određivanja antimikrobnog djelovanja 21
3.4. Metode određivanja antioksidacijskih svojstava meda 23
3.4.1. DPPH - metoda 23
3.4.2. FRAP metoda 24
3.4.3. ABTS metoda 25
4. REZULTATI 26
4.1. KEMIJSKI SASTAV MEDA MANUKE 27
4.1.1. Voda 27
4.1.2. Ugljikohidrati 28
4.1.3. Proteini 28
4.1.4. Aminokiseline 30
4.1.5. 5-Hidroksimetilfurfural 30
4.1.6. Ostali produkti Maillard-ove reakcije 31
4.1.7. Ostale tvari 31
4.1.8. Antioksidansi 33
4.1.9. Polifenoli 33

4.1.10. 1,2-Dikarbonilni spojevi 35
4.1.11. Cvjetni markeri meda manuke 36
4.1.11.1. Hlapljivi spojevi 36
4.1.11.2. Nehlapljivi spojevi 37
4.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST MEDA MANUKE 40
4.2.1. Antioksidacijska aktivnost 40
4.2.2. Antimikrobna aktivnost 41
4.2.3. Tretiranje rana 43
4.2.4. Citotoksična aktivnost 44
4.2.5. Imunostimulacijska aktivnost 45
4.2.6. Antiinflamatorna aktivnost 45
4.2.7. Primjena u gastroenterologiji 46
4.2.7.1. Dijareja 46
4.2.7.2. Peptički ulkus i gastritis 46
4.2.7.3. Poboljšanje probave i apsorpcije 47
4.2.8. Antivirusna aktivnost 47
4.2.9. Antifungalna aktivnost 48
4.2.10. Antiparazitska aktivnost 48
4.2.11. Primjena u oftalmologiji 48
4.2.12. Primjena kod kardiovaskularnih bolesti 48
4.2.13. Primjena kod dijabetesa 49
4.2.14. Primjena kod neuroloških poremećaja 49
4.2.15. Med kao antitusik 50
4.2.16. Utjecaj meda na oralno zdravlje 50
4.2.17. Utjecaj meda na sportske rezultate 50
4.2.18. Primjena meda u dječjoj prehrani 51
4.2.19. Utjecaj meda na plodnost 51
4.2.20. Primjena meda u kozmetičke svrhe 51
5. RASPRAVA 52
5.1. Zahtjevi kakvoće meda 53
5.2. KEMIJSKI SASTAV 54
5.2.1. Antioksidansi 54
5.2.2. Flavonoidi 56
5.2.3. 1,2-Dikarbonilni spojevi 57

5.3. Botaničko i zemljopisno podrijetlo meda manuke 58
5.3.1. Melisopalinologija 59
5.3.2. Reologija 59
5.3.3. Cvjetni markeri meda manuke 60
5.3.3.1. Hlapljivi spojevi 60
5.3.3.2. Fluorescencijski markeri 61
5.3.3.3. Drugi nefluorescencijski markeri (nehlapljivi spojevi) 62
5.4. BIOLOŠKA AKTIVNOST 62
5.4.1. Mehanizam antioksidacijske aktivnosti 62
5.4.2. Mehanizam antimikrobne aktivnosti 64
5.4.3. Mehanizam djelovanja u zacjeljivanju rana 68
5.4.4. Mehanizam citotoksične aktivnosti 70
5.4.5. Pretpostavljeni mehanizmi djelovanja meda manuke u različitim indikacijama 71
5.5. Nuspojave i kontraindikacije primjene meda u medicinske svrhe 72
6. ZAKLJUČCI 74
7. POPIS CITIRANE LITERATURE 79
8. SAŽETAK 94
9. SUMMARY 96

1. UVOD

1.1. Povijest meda u medicini

Već stoljećima med ima veliko značenje u tradicionalnoj medicini za mnoga oboljenja. Upotreba meda je opisana na crtežima iz kamenog doba prije 8000 godina. Stari Egipćani, Asirci, Kinezi, Grci i Rimljani upotrebljavali su med za tretiranje rana i bolesti gastrointestinalnog sustava [1]. Med kao lijek je dokumentiran na mnogim papirusima, pločama i knjigama: sumeranske glinene ploče (6200 pr. Kr.), egipatski papirusi (1900.-1250. pr. Kr.), Veda (stara oko 5000 godina), Kuran, Talmud, Biblija, svete knjige Kine, Indije, Perzije i Egipta [2].

U medicini starih Egipćana, med je bio najčešće upotrebljavani sastojak receptura za unutarnju kao i vanjsku upotrebu. Skoro pa svi egipatski lijekovi su sadržavali med u kombinaciji s vinom i mlijekom. Med su prinosili i kao žrtvu svojim božanstvima te za balzamiranje mrtvih [3]. S njim su tretirali abdominalne bolove, retenciju urina te u obliku masti za suhu kožu, rane, opekotine, iritacije kože i bolesti oka [4].

U staroj Grčkoj je Aristotel prvi opisao proizvodnju meda te je vjerovao da konzumacija meda produljuje život. Hipokrat je propisivao jednostavnu prehranu, davajući prednost medu u obliku oksimela (ocat i med) protiv boli, hidromela (voda i med) protiv žeđi i kod akutne povišene temperature smjesu meda, vode i različitih ljekovitih tvari. Koristio je med za liječenje ćelavosti, za kontracepciju, kao laksativ, topikalni antiseptik, kod kašlja i bolnog grla, bolesti oka, u zacjeljivanju rana i prevenciji i liječenju ožiljaka [1, 3, 4].

U starom Rimu, med je često spominjao Vergilije, koji je u svom djelu Georgike detaljno opisao proizvodnju meda, dok je Plinije naveo neke od indikacija meda: bol u usnoj šupljini, pneumonija, pleuritis te ubod zmije. U vrijeme Julija Cezara, med se koristio za plaćanje poreza kao zamjena za zlato. U rimskoj farmakopeji, med je bio najkorisnija tvar.

Med je također u indijskoj ayurveda medicini jedan od najvažnijih lijekova za unutarnju i vanjsku primjenu. Koristi se s drugim lijekovima kako bi povećao njihovu učinkovitost i ublažio nuspojave. Ima mnogobrojne indikacije poput opstipacije, kašlja, grlobolje, bolesti usne šupljine i zubiju, bolesti oka i prevencija katarakte, insomnije, pretilosti, dijabetesa, astme, kardijalne boli i palpitacija, povraćanje, dijareja i zacjeljivanje rana. Prirodni je konzervans i zaslađivač, a prednost se daje uvijek hladnom medu.

U tradicionalnoj kineskoj medicini med ima balansirani karakter (ni Yin niti Yang) i djeluje po pravilu elementa zemlje ulazeći u pluća, slezenu i crijeva. Koristi se uglavnom kod

bakterijskih infekcija, gastrointestinalnih (GIT) bolesti, alergijskih i imunoloških problema i rana [3, 4, 5].

U 20. stoljeću med se počinje intenzivnije istraživati, osobito njegova antimikrobna svojstva te sposobnost ubrzanja zacjeljivanja rana. Med je nazvan „inhibin“ zbog svog antimikrobnog djelovanja, a White, et al. su identificirali „inhibin“ kao vodikov peroksid koji nastaje glukoza oksidaznim procesom [6]. Uvođenjem antibiotika, pozitivni učinci meda su zanemareni, no posebno u zadnja dva desetljeća, med se počeo ponovno intenzivno istraživati, osobito u tretiranju različitih rana, opekotina i težih infekcija.

Američka farmaceutska organizacija (AphA; 1916.-1935.) je preporučila smjesu meda, malo vode i sok limuna za grlobolju te med od ruže s boraksom protiv bolnog grla i ulceracija kože. U američkom medicinskom arhivu mogu se naći mnoge indikacije, međuostalim prevencija infekcija rana.

Zadnjih godina, s dolaskom sve popularnije funkcionalne hrane, istraživanja se šire na druga potencijalna ljekovita svojstva meda u unaprjeđenju zdravlja. Moguća je nova uloga u prehrani na temelju njegovih fitokemijskih i antioksidacijskih tvari i njihovog učinka na zdravlje i metabolizam [2, 4].

1.2. Apiterapija

Apiterapija (lat. *Apis* = pčela) je primjena pčelinjih proizvoda u svrhu prevencije i liječenja bolesti. Dio je tradicionalne i komplementarne medicine.

50-ih godina prošloga stoljeća razvio se pojam „apiterapija“ te je u Japanu nastala i apipunktura, terapija ubodima pčela na akupunkturnim točkama. Nakon drugog svjetskog rata otkrićem prvog antibiotika penicilina, apiterapija je zanemarena, no pojavom sve više rezistentnih bakterija na antibiotike doživljava preporod.

Pčela skuplja i proizvodi vrijedne ljekovite tvari u strogo organiziranom timskom radu. Košnica se sastoji od matice, radilica i trutova te svaka pčela ima svoju ulogu, zadaće i prava u zajednici ovisno o grupi kojoj pripada i dobi. Jedna košnica može unutar jedne godine skupiti od 15 do 50 kg meda, pritom oprašuje biljke i stoga ima neprocjenjivu vrijednost za čovječanstvo [7, 8].

Dr Stefan Stangaciu (direktor International Federation of Beekeepers' Association) je napravio smjernice u apiterapiji u kojima međuostalim predlaže prethodno napraviti alergo-

test, no i „simillia similibus curantur“ tj. slično se liječi sličnim što bi značilo da se male doze pčelinjih proizvoda mogu koristiti za liječenje alergija na pčelinje proizvode. Ističe kako je u apiterapiji potrebno strpljenje i ustrajnost, posebice u kroničnim bolestima [9].

1.2.1. Pčelinji proizvodi

Pčelinji proizvodi primjenjivani u apiterapiji su med, propolis, matična mliječ, pelud, pčelinji otrov i pčelinji vosak.

Registrirani su kao hrana (med, polen, matična mliječ), aditiv (vosak) i lijekovi (propolis, pčelinji otrov). Polemika oko pčelinjih proizvoda registriranih kao hrana je što zakonski, unatoč nedvojbenim ljekovitim svojstvima, ne mogu biti odobrene zdravstvene tvrdnje koje se odnose na određene indikacije ili u potpomaganju djelovanja lijekova. Hrana može biti potpora u održavanju zdravlja, prehrane i općeg blagostanja [7].

Polen (cvjetni prah, pelud) je sirovi materijal od kojeg pčele proizvode pčelinji kruh, glavni izvor proteina košnice te nutritivnih i mineralnih tvari za daljnju proizvodnju matične mliječi. Pčele skupljaju polen s prašnika cvjetova, miješaju s malo sekreta žlijezda slinovnica i nektara te smještaju u specifične košarice, na tibiji stražnjih nogu i transportiraju do košnica gdje se pohranjuje u saće. Površina sakupljenog polena prekrivena je tankim slojem meda i voska. Iz polena nastaje pčelinji kruh koji prolazi kroz anaerobnu fermentaciju te ostaje sačuvan zbog prisutne mliječne kiseline.

Polen sadrži 7,5-40% proteina (uključujući esencijalne aminokiseline), značajne količine nukleinskih kiselina (posebice ribonukleinske), 15-50% ugljikohidrata (najviše fruktoze i glukoze), do 18% škroba, 5,1% lipida (esencijalne masne kiseline, fosfolipidi, fitosteroli), 1,6% fenola (flavonoidi, leukotrieni, katehini, fenolne kiseline), 0,7% vitamina, 1,6% makro- i mikronutrijenata.

Polen je indiciran u hiperlipidemiji, hipertenziji, prevenciji infarkta miokarda i moždanog udara, anemiji, detoksikaciji (otrovanja teškim metalima, industrijskim plinovima i prašinom, lijekovima; kolestatska bolest jetre, toksična i posttraumatska oštećenja jetre), kroničnoj alkoholnoj bolesti, akutnoj i kroničnoj upali (inhibira COX i LOX enzime), inicijalnim degenerativnim stanjima, kod djece s manjkom apetita i usporenog razvoja, malapsorpcije (sindrom nedovoljne apsorpcije jednostavnih hranjivih tvari u crijevima), u oporavku nakon operacija, teških fizičkih i psihičkih napora (poboljšava funkcije mozga i imunitet), kod umora, depresije (smanjuje doze i nuspojave antidepresiva), hiperplazije prostate, rana, opekotina te ima spazmolitički, fibrinolitički, antibakterijski i antimikotski učinak [10, 11].

Matična mliječ (Gelee royale) je sekret hipofaringealnih i mandibularnih pčela radilica starih od šest do dvanaest dana. Esencijalna je hrana za larve matica, odmah se konzumira, ne pohranjuje se. Jedina mogućnost njenog prikupljanja je tijekom uzgoja larve matice, kada je larva opskrbljena izobiljem matične mliječi pa ne može konzumirati toliko hrane. Matična mliječ se tada akumulira te postaje dostupna za prikupljanje. Zbog dugog vijeka i fertiliteta matice, javio se interes za matičnu mliječ.

Kompleksne je strukture i kiselog pH (3,6 do 4,2). Oko 75% čini voda, no suhu masu čine 17-45% proteini (uključujući sve esencijalne aminokiseline), 18-52% ugljikohidrati (90% fruktoza i glukoza), 3,5-19% lipidi (do 90% slobodne masne kiseline, glavna masna kiselina je 10-hidroksidec-2-enska kiselina), 2-3% minerali, vitamini (uglavnom B skupina), nukleotidi kao slobodne baze, fosfati (AMP, ADP, ATP), acetilkolin, glukuronska kiselina, ekstremno male količine testosterona.

Učinci matične mliječi su: antibakterijski, antivirusni, antimikotski, tonik, stimulans (povećava psihičke i fizičke sposobnosti), poboljšava mentalno i opće zdravlje, povećava tek (kod anoreksije), antitumorsko, antioksidacijsko, protuupalno i antialergijsko djelovanje, protiv starenja, antihipertenziv, hipolipemik, povećava eritropoezu (kod anemije), povisuje testosteron, a time moguće smanjuje i rezistenciju na inzulin, povećava kvalitetu života muškaraca i postmenopauzalnih žena te djeluje antidepresivno i anksiolitički [11, 12].

Pčelinji vosak je prirodni vosak kojeg proizvode u tekućem obliku mlade pčele radilice pomoću voštanih žlijezda na zatku. U dodiru sa zrakom nastaje kruti oblik u obliku ljusaka koje pčele oblikuju pomoću čeljusti kako bi stvorile saće, dodajući polen i propolis te je zbog toga žute boje (*Cera flava*), koji starenjem poprima smeđu boju. Izbjeljivanjem postaje bijel i gubi se miris (*Cera alba*).

Kompleksna je smjesa pretežito dugolančanih ugljikohidrata i lipida; 12-16% ugljikohidrati, 12-14% slobodne masne kiseline, 1% slobodni masni alkoholi, 35-45% linearni alifatski mono- i hidroksimonoesteri, 15-27% kompleksni alifatski esteri i egzogene tvari koje su ostaci polena, propolisa, biljnih tvari i onečišćenja.

Pčelinji vosak ima antimikrobni, antimikotski učinak (djeluje sinergistički s medom, maslinovim uljem), koristi se kod rana, opekotina, modrica, upala, prehlade (žvače se tamni vosak), u farmaceutici za oblaganje lijekova odgođenog ili produženog djelovanja te za punjenje kapsula, u kozmetici (učvršćuje emulzificirane otopine, olakšava stvaranje stabilnih

emulzija, povećava sposobnost vezanja vode u kremama i mastima) te ima mnogobrojnu nemedicinsku primjenu [11, 13].

Propolis (pčelinje ljepilo; grč. *pro* – ispred, *polis* - grad) je smolasta mješavina koju prikupljaju pčele s pupoljaka i izlučevina biljaka pomiješanih s enzimima, polenom i voskom. Skupljaju ih pomoću čeljusti, prenose na stražnjim nogama i pritom mješaju smole sa svojom slinom i drugim sekretima. Pčele koriste propolis u svrhu zaštite košnica, popravljanja saća i kod sprječavanja ulaska nametnika.

Sastav propolisa, a stoga i biološka aktivnost, ovise o mjestu i vremenu prikupljanja te biljnom izvoru. Čine ga oko 50% smole (flavonoidi, fenolna kiseline), 30% voskovi, 10% isparljivi spojevi, 5% polen, 5% druge organske tvari.

Djeluje antibakterijski, antivirusno, antimikotski, antiparazitski, antiseptički, anestetički, citotoksično, hepatoprotektivno, antioksidacijski, antiulcerativno, protuupalno, imunomodulatorno, antihipertenzivno, smanjuje kolesterol i glukozu u krvi (GUK), prevenira nastanak karijesa, koristi se kod gingivitisa, stomatitisa, kašlja i prehlada, rana, opekotina, akni, labijalnog i genitalnog herpesa te neurodermatitisa [11, 14, 15, 16, 17, 18].

Pčelinji otrov (apitoksin) nastaje u dvjema žlijezdama pčela povezanih sa žalcem na zatku. Proizvode ga pčele radilice u prva dva tjedna svog života, a njegova koncentracija smanjuje se sa starošću pčele. Vrećica otrova sadrži od 0,15 do 0,3 mg otrova. U samoobrani koriste svoj otrov, pritom često cijeli žalčani aparat zaostaje u koži suparnika, što može imati fatalne posljedice za pčelu.

Sastoji se od enzima (10-12% fosfolipaza A_2, 1-3% hijaluronidaza), proteina i peptida (50% melitin; pamin, kinin, inhibitori proteaze), fiziološki aktivnih amina (histamin, dopamin, noradrenalin), aminokiselina, ugljikohidrata (2% glukoza i fruktoza), 5% fosfolipida i 4-8% isparljivih tvari.

Djeluje antibakterijski, protuupalno, analgetski, antireumatski (smanjenje doze konvencionalnih lijekova i smanjenje incidencije relapsa), kod imunoloških, neurodegenerativnih, autoimunih bolesti (sistemski eritemski lupus – SLE, multipla skleroza -MS, reumatoidni artritis - RA) te Parkinsona (modulira stanice imunološkog sustava, glija stanice i neurone središnjeg živčanog sustava), astme, alergijskog rinokonjuktivitisa, atopijskog dermatitisa, oralnih patogena. Paradoksalno je što apitoksin ima nociceptivni i antinociceptivni učinak te što djeluje antialergijski, a potencijalni je snažni alergen [11, 19, 20, 21].

1.2.2. Definiranje meda

Med je droga zoološkog podrijetla; sladak, gust, viskozan, tekući ili kristaliziran proizvod što ga medonosne pčele (*Apis mellifera*) proizvode od nektara cvjetova medonosnih biljaka ili sekreta živih dijelova biljaka ili izlučevina kukaca koji sišu na živim dijelovima biljaka (medna rosa), koje pčele skupljaju, dodaju mu vlastite specifične tvari, pohranjuju, izdvajaju vodu i odlažu u stanice saća do sazrijevanja.

Pčele skupljaju nektar i prerađuju ga u svom mednom mjehuru. Pomoću enzima pretvaraju saharozu iz nektara u glukozu i fruktozu, a višak vode uklanja se prozračivanjem košnice i prerađivanjem izlučevinama žlijezda pčela (hidrolitički enzimi) [22, 23, 24, 25, 26, 27].

Monografija Mel – med je u malom broju farmakopeja. Za farmaceutske svrhe rabi se uglavnom *mel depuratum* – pročišćeni med. Postupnim postupkom su uklonjeni pelud, bjelančevine, vosak i drugi čvrsti sastojci [23].

1.2.3. Vrste meda

Prema podrijetlu med se dijeli na:

a) Nektarni ili cvjetni med
b) Medljikovac, medun ili šumski med

Biljni sok je sirovina za obe vrste, no kad prolazi kroz nektarije (žlijezde u cvjetovima) pretvara se u nektar, a ako su posrednici insekti, poput lisnih ušiju, nastaje medljika ili medna rosa.

Nektarni med je med dobiven od nektara cvijeća. Nektar izlučuju cvjetovi većine cvjetnica koje oprašuju kukci, medonosne biljke (lipa, bagrem, kadulja, livadno bilje i dr.), a može biti monoflorni i poliflorni. Kvalitetu i količinu nektara (slatki sok kojeg izlučuju nektarije) ocjenjujemo vrijednošću šećera, tj. umnoškom konc. šećera (u postotcima) i količine (u mg) izlučene u 24 sata.

Nektar sadrži od 28 do 97% vode, od 3 do 72% šećera, isparljive spojeve, organske kiseline, dušikove spojeve, vitamine, tvari boje i zrnca peludi.

Svježi nektar sadrži različite količine saharoze i drugih šećera. Uslijed djelovanja enzima tijekom zrenja ti se šećeri razgrađuju u jednostavne, glukozu i fruktozu. Neki nektari sadrže veće količine saharoze (kadulja 76,5%, bijela djetelina 63,5%, lipa 50%), dok nektar

uljane repice sadrži tek 2,1% tog disaharida. Nektar sadrži i mnogo vode, stoga ga pčele trebaju preraditi, kako bi se prevenirala fermentacija tj. kvarenje meda [22, 24, 25].

Monoflorni (uniflorni) med je med koji u netopivom sedimentu sadrži najmanje 45% peludnih zrnaca iste biljne vrste; iznimke su pitomi kesten (*Castanea sativa*) 85%, manuka (*Leptospermum scoparium*) 70%, lucerna (*Medicago sp.*) 30%, ružmarin (*Rosmarinus officinalis*) 30%, lipa (*Tilia sp.*) 25%, kadulja (*Salvia sp.*) 20%, bagrem (*Robinia pseudacacia*) 20%, lavanda (*Lavandula sp.*) 20%. Antibakterijska i antioksidacijska aktivnost meda značajno ovise o botaničkom podrijetlu meda te se posljedično koriste za različite indikacije različite vrste meda. Apsolutni monoflorni med ne postoji pošto pčele ne posjećuju samo jednu biljnu vrstu [5, 25].

Poliflorni med je mješavina meda različitih vrsta.

Medljikovac je med dobiven uglavnom od izlučevina kukaca (*Hemiptera*; lisne uši i štitne uši) koji žive na živim dijelovima biljaka ili od sekreta živih dijelova biljaka. Ta izlučevina je medljika ili medna rosa (crnogorice ili bjelogorice; najčešće smreka, jela, hrast), slatka, ljepljiva prevlaka na biljnim listovima.

Sadrži od 5 do 18% suhe tvari; 90-95% šećera, aminokiseline (dušikovi spojevi), organske kiseline, proteine, kloride, fosfate, kalij, magnezij, sterole, vitamine (osobito C) i enzime.

Sastoji se od različitih šećera iz floemskog soka i drugih šećera nastalih iz floemskog soka, ali prerađenih probavnim sokovima sisajućih kukaca. Enzimi invertiraju i razlažu šećere, ali mogu i napraviti nove transglukozilacijom i transfruktozilacijom pa nastaju složeni šećeri. Na taj način primjerice iz disaharida saharoze u floemskom soku pripajanjem glukoze nastane trisaharid, melecitoza, koja uzrokuje da se med, nastao iz medne rose u saću, brzo kristalizira.

Tamni je med jakog okusa. Sadrži širi raspon šećera od nektarnog meda i više se cijeni u Europi. U vrijeme suše, kad je dostupno malo ili nimalo nektara, znatno se povećava broj lisnih ušiju koje proizvode velike količine medljike. Nedostatak stvaranja medljike je što može uzrokovati probleme pčelama, zaraziti ih dizenterijom pošto sadrži neprobavljive tvari. Osim toga, ako pčele skupljaju većinom medljiku, bit će im potrebno prihranjivanje zimi jer u medljici nema peludi.

Medljikovac se od cvjetnog meda razlučuje metodom električne vodljivosti, koja mora biti veća od 1,00 mS/cm.

Miješani med je mješavina nektarnog meda i medljikovca. Takvi su npr. lipov i kestenov med, naime tijekom cvatnje lipe i kestena, pojavi se i brojna populacija ušiju, stoga nastaje i puno medne rose[22, 24, 25, 26, 27].

Prema načinu proizvodnje:

a) med u saću - med kojeg pčele skladište u stanicama svježe izgrađenog saća bez legla ili u satnim osnovama izgrađenim isključivo od pčelinjeg voska, koji se prodaje u poklopljenom saću ili u sekcijama takvog saća
b) med sa saćem ili dijelovi saća u medu – sadrži jedan ili više dijelova novoizgrađenoga saća, bez legla, u medu
c) cijeđeni med – dobiva se ocjeđivanjem otklopljenog saća bez legla
d) vrcani med - dobiva se vrcanjem (centrifugiranjem) otklopljenog saća bez legla
e) prešani med – dobiva se prešanjem saća bez legla, uz ili bez uporabe topline koja ne smije prijeći 45°C
f) filtrirani med – dobiven tako da se pri uklanjanja stranih anorganskih ili organskih primjesa odstranio i znatan dio peludi

Pekarski med je med koji se koristi u industriji ili kao sastojak hrane koja se potom prerađuje i može imati strani okus ili miris, biti u stanju vrenja ili prevrio te biti pregrijan. Kod stavljanja ovakvog meda u promet, na etiketi mora stajati oznaka „samo za kuhanje i pečenje“ [22, 24].

Prema boji razlikujemo svijetli, tamni i med u međunijansama[22].

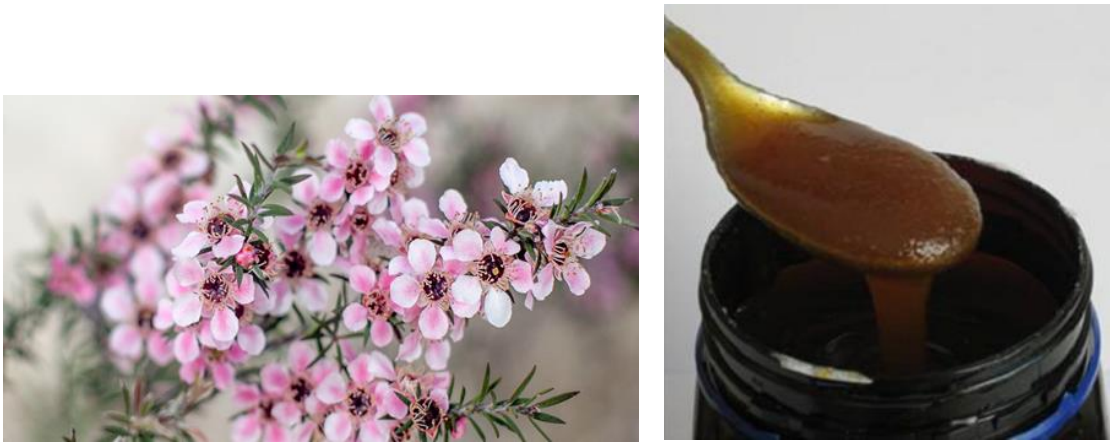
1.3. Manuka med

Manuka med je tamni, monoflorni med dobiven iz uvijek zelene manuka biljke, *Leptospermum scoparium*, porodica Myrtaceae, koja raste kao grm ili malo stablo na Novom Zelandu i u istočnoj Australiji. Najčešće naraste do 2 m (maksimalno 4 m), ima čvrstu koru, eliptične listove, cvjetove bijele ili roze boje (Slika 1.) te cvjeta od listopada do veljače. Nastali manuka med varira od svijetlo do intenzivno smeđe boje, s konzistencijom od tekuće do vrlo viskozne. Okus se može opisati kao manje sladak, aromatičan, opor do začinjen [28].

U tradicionalnoj medicini se biljka koristila kao sedativ i za zacjeljivanje rana, a manuka med za čišćenje infekcija kao što su apscesi, kirurške rane, opekotine i ulceri različite etiologije. Godišnje se proizvede od 1500 do 2000 t.

Trenutno se proučavaju glavne bioaktivne tvari manuka meda i mehanizmi odgovorni za njegovu biološku aktivnost. Ova istraživanja podupiru njegovu povećanu upotrebu u dermatologiji te osnovu za izolaciju i pročišćavanje tvari za razvoj biofarmaceutskih proizvoda s antimikrobnim svojstvima i za zacjeljivanje rana [29].

Trenutna rastuća rezistencija na antibiotike je povećala zanimanje za manuka medom kao djelatnom tvari, posebno zbog njegovih antibakterijskih svojstava kod tretiranja rana.



Slika 1. Manuka biljka (*Leptospermum scoparium*) i manuka med.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog diplomskog rada je sustavni pregled dostupne literature i znanstvernih radova o kemijskom sastavu i biološkoj aktivnosti meda manuke. Iz literaturnih podataka potrebno je izdvojiti metode određivanja (klasične i suvremene) kemijskog sastava meda manuke te metode određivanja njegove antioksidacijske i antimikrobne aktivnosti. Ukratko je potrebno prezentirati dobivene rezultate te se osvrnuti na biološke učinke i terapijsku primjenu meda manuke. Kroz raspravu usporediti dobivene rezultate te mehanizme antioksidacijskog i antimikrobnog djelovanja meda manuke, kao i djelovanja na zacjeljivanje rana.

3. MATERIJALI I METODE

U svrhu izrade diplomskog rada, korišteni su znanstveni radovi dostupni na mrežnim stranicama PubMed, OvidMEDLINE, Web of Science, Scopus, Google Scholar i Cochrane Library kao i ostala dostupna literatura te stručne knjige i časopisi.

3.1. Metode određivanja botaničkog i zemljopisnog podrijetla meda

Ovisno o tipu vegetacije, razdoblju cvatnje biljnih vrsta ili proizvodnji medljike od strane kukaca te o vremenu kad je med proizveden od strane pčelara mijenja se udio nektara ili medljike pojedinih biljnih vrsta u medu. Apsolutni monoflorni med ne postoji pošto pčele nikad ne posjećuju samo jednu biljnu vrstu, čak i ako ona dominira na jednom području. Iz tih razloga kemijski sastav i organoleptička svojstva između uzoraka meda značajno variraju.

3.1.1. Klasične metode

Za pravilnu deklaraciju i određivanje cijene meda, prema Europskoj direktivi ključne su informacije o botaničkom i zemljopisnom podrijetlu meda, je li proizvod nastao u potpunosti ili većinskim dijelom iz indiciranog izvora te posjeduje li organoleptičke, fizikalno-kemijske i mikroskopske karakteristike izvora[30]. Navedene parametre je potrebno pratiti najmanje tri godine te na osnovu višegodišnjeg praćenja, prema prosjeku podataka, moguće je ustanoviti minimalne uvjete koje mora zadovoljavati zaštićeni proizvod radi prepoznatljivosti na tržištu [31]. Kod meda manuke je bitna i klasifikacija temeljena na sadržaju metilglioksala (MGO) koji je odgovoran za neperoksidnu antibakterijsku aktivnost (NPA).

Melisopalinologija (peludna analiza) temelji se na identifikaciji i kvantifikaciji peludnih zrnaca meda mikroskopskom analizom, većinom svjetlosnim mikroskopom. Sva peludna zrnca u vidnom polju se prebroje i razvrstavaju prema biljnoj vrsti, a potom uspoređuju s referentnim preparatima. Biljna vrsta se određuje prema obliku, veličini zrnaca, građi i boji vanjske stijenke, obliku i broju pora klijanja.

Nedostaci ove metode su što oduzima puno vremena, iziskuje specijalizirano znanje i vještine, proces brojanja je zahtjevan, kao i interpretacija rezultata i identifikacija botaničkog podrijetla. Potrebno je dobro iskustvo i znanje morfologije peludi te dostupnost opsežne zbirke peludnih zrnaca. Moguće su i promjene peludnog sastava u medu djelovanjem pčela i pčelara [32]. Melisopalinološkom analizom nije moguće razlikovati med manuke i kanuke s Novog Zelanda zbog reološke sličnosti peludnih zrnaca.



Slika 2. Peludno zrnce meda manuke [33].

Kod **fizikalno-kemijskih analiza meda** najučestaliji su parametri električna vodljivost, optička aktivnost i sastav šećera. Razlučivanje meda medljikovca od nektarnog meda postiže se spektrom i postotkom pojedinih šećera. Pri utvrđivanju botaničkog podrijetla meda može se koristiti odnos glukoze i fruktoze, glukoze i vode u medu te sadržaj dijastaze. Ostala bitna fizikalna svojstva meda su kristalizacija, viskoznost, higroskopnost, indeks refrakcije i specifična masa te su usko povezana s kemijskim sastavom meda. Vrijednosti ovih parametara pojedinih vrsta meda će biti specifične i različite zbog variranja sastava meda [34].

Određivanje **organoleptičkih svojstava meda** je treća vrsta klasičnih metoda u određivanju botaničkog i zemljopisnog podrijetla. Najvažniji su boja, okus i miris. Boja meda manuke je svijetlo jantarna, prema ljestvici po Pfundu 84 mm. Ima miris po vlažnoj zemlji, aromatičnom vrijesku. Okus je mineralan, blago ljut, osebujan [35].

3.1.2. Suvremene metode

Upotreba novijih instrumentalnih tehnika proizašla je iz potrebe za što točnijim i bržim metodama karakterizacije meda, koje bi bile prikladne za rutinsku analizu, uključujući mnogo uzoraka u kratkom vremenskom periodu. U tu skupinu spadaju AAS (atomska apsorpcijska spektroskopija), HPLC (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti), GC-MS (plinska kromatografija s masenom spektrometrijom), TLC (tankoslojna kromatografija), NMR (nuklearna magnetska rezonancija), FT-IR (infracrvena spektroskopija s Furierovom transformatormacijom), NIR (bliska infracrvena spektroskopija) i dr [32].

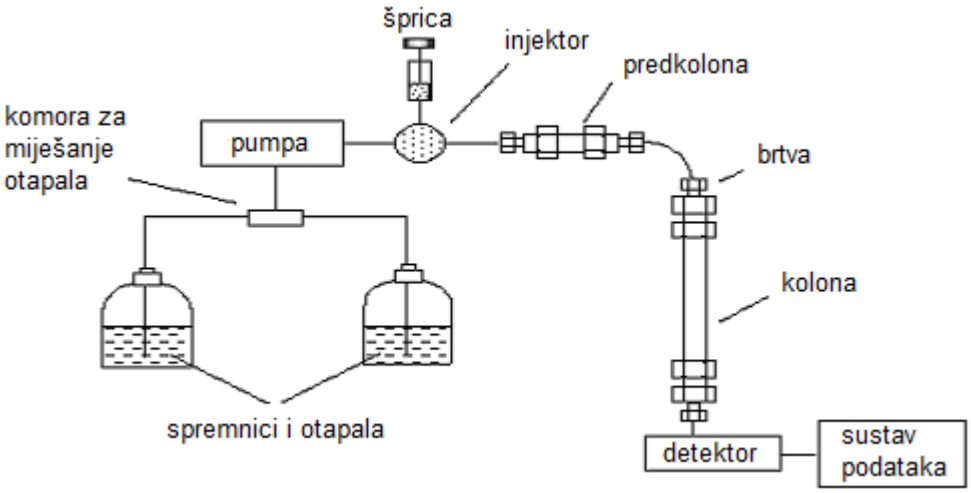
Analitička metoda uključuje uzorkovanje (skupljanje uzorka), pripremanje uzorka (odvajanje od matriksa, koncentriranje, frakcioniranje i derivatizaciju ukoliko je potrebna), separaciju, detekciju i analizu podataka.

Naziv **kromatografija** potječe od ruskog botaničara Cveta koji je 1906. godine uveo ovu tehniku za odjeljivanje boja. Kasnije se ime prenijelo na sve postupke odjeljivanja kod kojih se komponente smjese razdjeljuju između stacionarne i mobilne faze. Keulemans je dao općenitu definiciju za ovu tehniku: „Kromatografija je metoda odjeljivanja kojom se komponente razdjeljuju između dviju faza; jedna je stacionarna s velikom površinom, a druga je mobilna.“

Stacionarna faza (nepokretna, adsorbens) može biti kruta ili tekuća, a mobilna (pokretna, eluens) tekuća ili plinovita. Mobilna faza putuje preko ili uzduž stacionarne faze utjecajem kapilarnih sila, sile teže, razlike tlakova i sl. Kromatografski proces se temelji na uspostavljanju dinamičke ravnoteže nekog spoja između stacionarne i mobilne faze; u stacionarnoj fazi nalazi se dio tvari koji je u ravnoteži s dijelom u mobilnoj fazi. Zbog gibanja mobilne faze narušava se ravnoteža, stoga molekule putuju u smjeru gibanja mobilne faze. Zbog specifične interakcije različitih spojeva sa stacionarnom i mobilnom fazom, različiti spojevi putuju različitim brzinama i tako se odjeljuju. Sami proces odjeljivanja zasniva se na sljedećim načelima: adsorpciji, razdjeljenju, difuziji, ionskoj izmjeni, kiralnosti i dr. Velika moć razlučivanja kromatografskih metoda zasniva se na pojavi uzastopnog ponavljanja primarnog postupka razdjeljivanja neke tvari između mobilne i stacionarne faze. Budući da se uspostavljanje ravnoteže neprestano ponavlja, već i male razlike u razdjeljivanju između stacionarne i mobilne faze dovode do dobrog odjeljivanja tvari. Na uspješnost kromatografije (osim prirode tvari, mobilne i stacionarne faze) utječu: brzina mobilne faze, temperatura sustava, omjer mase tvari koja se odjeljuje i stacionarne faze, veličina i oblik čestica adsorbensa i dr [36].

3.1.2.1.Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

HPLC (eng. high performance liquid chromatography), danas najrazvijeniji oblik kromatografije, je vrsta tekućinske kromatografije koja se koristi za odjeljivanje tvari iz otopine. Pozitivne osobine ove metode su dobra separacija različitih uzoraka, iznimna razdjelna snaga, brzina i vrlo nizak prag detekcije koji se kreće u nanomolima [37]. Osnovni dijelovi HPLC sustava su: kolona za odjeljivanje s punilima, pumpa koja pokreće mobilnu fazu kroz kolonu, spremnici mobilne faze, sustav za unošenje uzoraka (injektor), po mogućnosti predkolona, detektor s pisačem, integratorom i računalom (Slika 3.).



Slika 3. Shematski prikaz HPLC-a.

U tekućinskoj kromatografiji pokretna faza je kapljevina, a nepokretna faza različiti sorbensi (čvrsta tvar ili kapljevina na inertnom nosaču).

Otapala koja se koriste kao pokretna faza trebaju biti visoke čistoće te se prije korištenja trebaju osloboditi otopljenih plinova i/ili suspendiranih čestica, obično korištenjem mikroporoznih filtera pod vakuumom ili primjenom ultrazvuka. Izbor pogodnog otapala, odnosno smjese otapala, provodi se s obzirom na sposobnost otapala da stvaraju vodikove veze (odjeljivanje hidrofilnih, odnosno hidrofobnih spojeva). Otapalo prolazi kroz kolonu pod visokim tlakom. Visoki tlak je omogućio uporabu kolona s mnogo manjim promjerom čestica stacionarne faze (3-5 μm), značajno je poboljšao razdjeljivanje komponenti uzorka te je skraćeno vrijeme analize.

Pumpa služi za injektiranje pokretne faze pod visokim tlakom (do 15 MPa) stalnom brzinom (0,1-10 cm^3min^{-1}) u kolonu. Uzorak se unosi „autosamplerom“ ili ručno mikrolitarskom špricom u sustav za injektiranje, tzv. petlju u kojoj se održava tlak. Prebacivanjem ven-

tila, otapalo prolazi kroz injektor te nosi uzorak do kolone. Kratka predkolona ili predkolonski filter postavljaju se ispred analitičke kolone da bi je sačuvali od netopljivih i topljivih onečišćenja iz uzorka, npr. tvari koje se ireverzibilno vežu na stacionarnu fazu. Ova kolona je kraća od analitičke i obično punjena istim materijalom kao i analitička kolona. Analitička kolona je najčešće cijev izrađena od nehrđajućeg čelika, duljine 250 ili 150 mm, unutarnjeg promjera 4,6 mm, obično punjena česticama veličine 3,5 ili 5 mm [38].

Najčešće korišteni detektori za HPLC su spektroskopski detektori (UV/VIS, maseni detektor (MS)) jer oni omogućuju identifikaciju i detekciju, ali i određivanje tvari u vrlo niskim koncentracijama u ppb, zatim detektori indeksa loma, fluorescentni detektori (FLD) i elektrokemijski detektori. Detektori prate značajke pokretne faze ili otopljene tvari. U prvom slučaju mjeri se indeks loma ili vodljivost pa je analit, odnosno otopljena tvar dokazana neizravno promjenom ovih veličina. U drugom slučaju prate se karakteristike otopljene tvari, kao što su apsorpcija u UV/VIS području, fluorescencija ili struja na elektrodi.

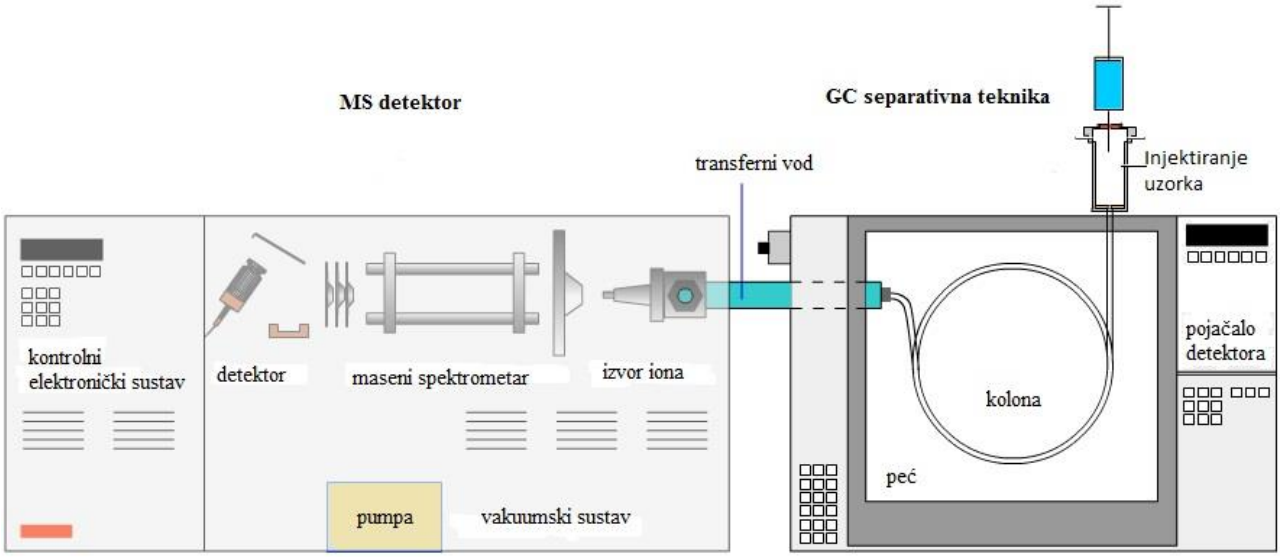
HPLC je separacijska tehnika koja odjeljuje i određuje tvari u smjesi. Omogućuje kvalitativnu i kvantitativnu analizu.

3.1.2.2.Vezani sustav plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS)

Plinska kromatografija je uspješna metoda za separaciju i kvantifikaciju, ali nepouzdana za kvalitativno određivanje, gdje je spektrometrija masa gotovo savršena. Spregnuta tehnika GC-MS (eng. gas chromatography-mass spectrometry) omogućuje dobivanje velikog broja podataka uz korištenje minimalne količine uzorka. Sastoji se od dvije glavne jedinice, plinskog kromatografa (GC) i spektrometra masa (MS) kao detektora (Slika 4.). Razlike u kemijskim svojstvima između različitih molekula smjese omogućuju razdvajanje molekula kako uzorak putuje kroz kolonu. Molekule trebaju različito vrijeme (retencijsko vrijeme ili vrijeme zadržavanja) za izlazak (eluiranje) iz GC-a, što MS-u omogućuje da „hvata“, ionizira i detektira ionizirane molekule zasebno. Spektrometar masa može analizirati uzorak na dva načina: tzv. cjelokupna analiza (full scan ili total ion chromatogram - TIC) kada analizator prati sve omjere mase i naboja (*m/z*), koristi se uglavnom za kvalitativne analize, ili tzv. selektivna analiza (selective ion monitoring - SIM), kada analizator prati samo odabrane omjere mase i naboja (*m/z*). Dakle, za svaki odijeljeni spoj spreguta tehnika GC-MS daje dva važna podatka za identifikaciju spoja: vrijeme zadržavanja spoja na koloni i spektar masa. Dobiveni spektar masa se uspoređuje s računalnom bazom spektara masa te se određuje postotak slaganja na osnovu čega se može identificirati spoj [37].

Ovom metodom analiziraju se spojevi koje je moguće dovesti u plinovito stanje pri temperaturama nižim od 400 °C, a da se pri tome ne raspadnu.

Prednost GC-MS u odnosu na tekućinsku kromatografiju su bogate biblioteke spektara koje se godinama nadopunjuju i olakšavaju identifikaciju nepoznatog analita.

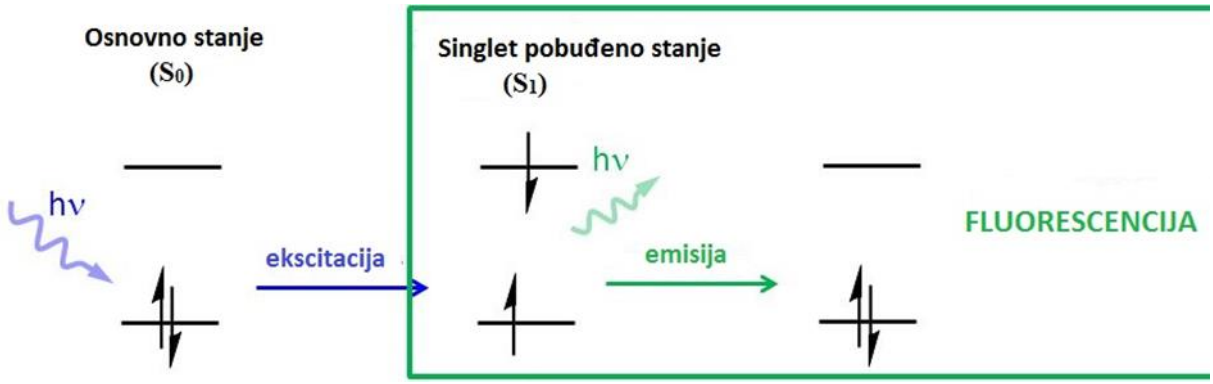


Slika 4. Shematski prikaz GC-MS-a.

3.2. Fluorescencijska spektrometrija (fluorimetrija)

Fluorescencija je emisija svjetlosti tvari koja je apsorbirala svjetlost ili neko drugo elektromagnetsko zračenje drukčije valne duljine. Emitirana svjetlost ima uglavnom dužu valnu duljinu, stoga i nižu energiju od apsorbiranog zračenja.

Fluorescencijska emisija nastaje kada se orbitalni elektron molekule spusti u svoj osnovni položaj emitirajući svjetlosni foton nekom od vrsta energije, nakon što je bio pobuđen, u viši kvantni položaj (Slika 5.).

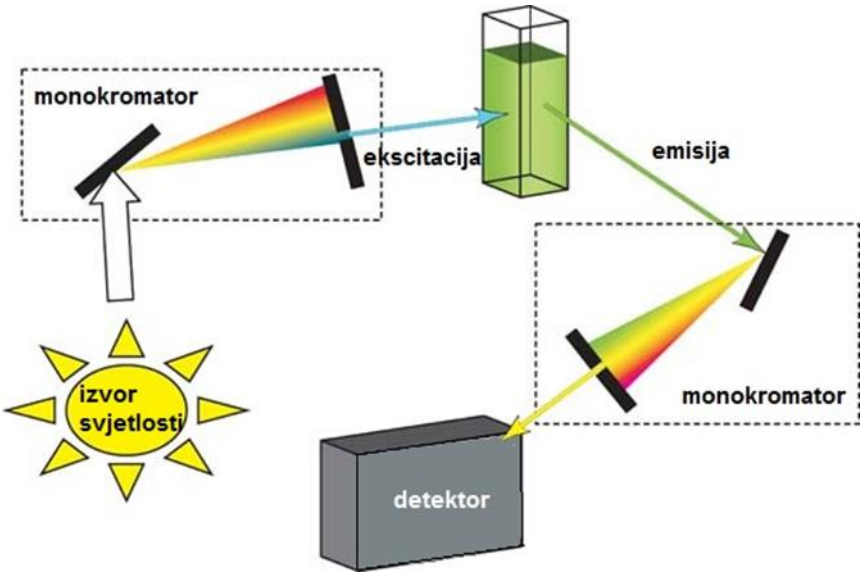


Slika 5. Svjetlost nastala ekscitacijom elektrona.

Fluorometrija je osjetljiva kvalitativna i kvantitativna analitička metoda. Određuje tvari na temelju pojave ili intenziteta njihove fluorescencije s pomoću fluorometra tj. spektrofluorometra. Ograničena je na tvari koje mogu fluorescirati ili se prevesti u oblik koji fluorescira. Analit se izloži ultraljubičastom zračenju, a nastala fluorescencija se mjeri fotoelektrički, pod pravim kutom na upadno zračenje (Slika 6.). Određuje se spektar fluorescencijske ekscitacije/emisije [39].

Novija je analitička metoda u istraživanju hrane, uključujući i med. Fluorometrijske metode su i do 1000 puta osjetljivije od drugih tehnika zasnovanih na apsorpciji [40]. Navedena metoda omogućava veću točnost, jasno određujući ekscitaciju i emisiju valnih duljina. Brza je i nedestruktivna metoda s pozitivnim odnosom cijena-djelotvornost [41].

Fluorimetrijom meda određuju se polifenoli, aminokiseline i produkti Maillard-ove reakcije, kao i drugi kemijski markeri meda manuke.



Slika 6. Shematski prikaz fluorescencijske spektrometrije.

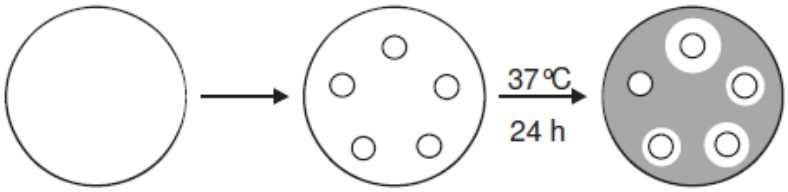
3.3. Metode određivanja antimikrobnog djelovanja

Osnovna metoda mjerenja antimikrobne aktivnosti meda je određivanje tzv. inhibicijskog broja definiranog kao stupanj razrjeđenja u kojem će med još uvijek zadržati antibakterijski učinak. Danas se antimikrobna aktivnost meda računa kao MIK (eng. MIC, minimal inhibitory concentration), najmanja koncentracija tvari koja inhibira rast mikroorganizama (*in vitro*).

Antibiogram je postupak kojim se ispituje osjetljivost bakterija na antibiotike. Osjetljivost bakterija na antibiotike može se testirati difuzijskim (kvalitativno) i dilucijskim (kvantitativno) metodama te kombinacijama (E-test).

Danas postoje i automatizirani sustavi za istovremenu brzu identifikaciju bakterija i ispitivanje osjetljivosti na antibiotike; te molekularne metode za detekciju gena rezistentnih na antibiotike.

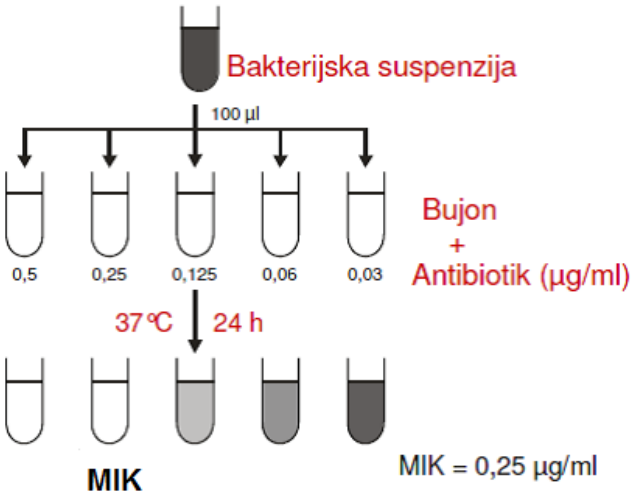
Difuzijska metoda se zasniva na principu difuzije antibiotika kroz čvrstu hranjivu podlogu (npr. agar) prethodno inokuliranu ispitivanom bakterijskom kulturom. Najčešće se izvodi kao disk-difuzija: papirnati disk natopljen standardiziranom količinom nekog antibiotika postavlja se na površinu krute podloge na koju se prethodno nasadi čista kultura ispitivane bakterije te se inkubira na temperaturi od 35 do 37 °C 12-24 sati. Antibiotik iz diska difundira u podlogu, te ako je djelotvoran, sprječava bakterije u rastu te bakterija raste tek na određenoj udaljenosti od diska. Taj izostanak rasta se naziva inhibicijom. Veličina zone inhibicije, izražena u milimetrima, približno je u linearnom odnosu prema MIK-u. Veličine zona inhibicije se interpretiraju kao: soj je osjetljiv, umjereno osjetljiv i rezistentan [42].



Slika 7. Difuzijska metoda.

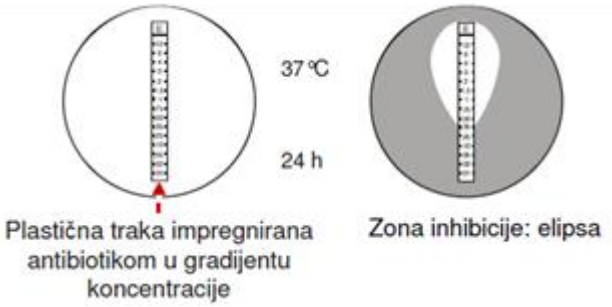
Metodom dilucije (razrjeđenja) određuje se najniža (minimalna) koncentracija antimikrobne tvari koja sprječava rast bakterija. Testiranje dilucijskom metodom može se raditi na tekućoj (bujon) ili krutoj (agar) podlozi, tako da se antimikrobna tvar serijski razrjeđuje (dvostruka razrjeđenja), inkorporira u bakteriološku podlogu i zatim se u ili na tako priređenu podlogu nasađuje ispitivani soj bakterija. Nakon 18-24 sata promatra se je li se bujon zamutio,

odnosno jesu li na krutoj podlozi narasle bakterije. Koncentracija antimikrobne tvari koja se nalazi u prvoj podlozi na kojoj nema porasta bakterija (bujon ostaje bistar), naziva se minimalnom inhibicijskom koncentracijom (MIK) i izražava se u g/mL. Ako se u dilucijskoj tehnici u bujonu nakon inkubacije od 18-24 sata podloge bez vidljiva porasta bakterija presade u krutu podlogu bez antibiotika, može se odrediti i minimalna baktericidna koncentracija (MBK), tj. ona najmanja koncentracija koja ubija bakterije; izražava se također u g/mL. MBK je u pravilu veća od MIK [42].



Slika 8. Primjer određivanja MIK-a dilucijskom metodom.

E-test je kombinacija dilucijske i difuzijske metode. Na posebnu traku je adsorbiran antibiotik u gradijentu koncentracije. Traka se položi na podlogu nasađenu kao za difuzijski test, antibiotik difundira s trake u različitoj količini, pa se stvara gradijent koncentracije u podlozi te se prema veličini zone inhibicije rasta može očitati MIK[42].



Slika 9. E-test metoda – određivanje MIK-a.

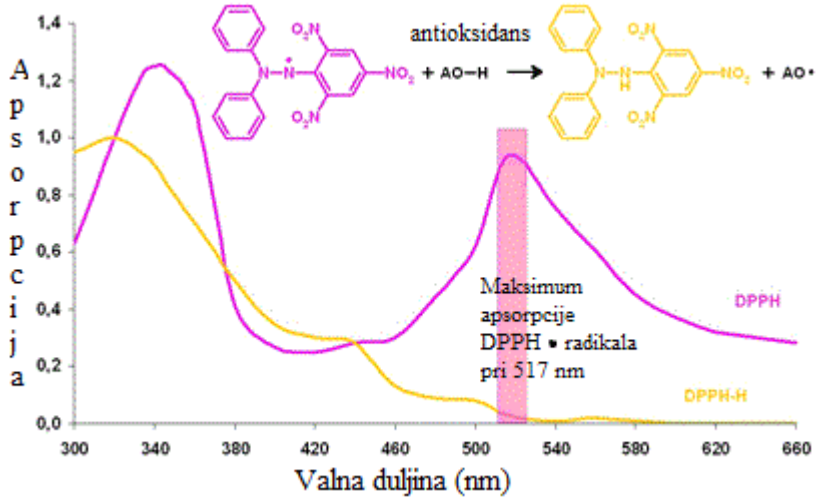
Agar-difuzijska metoda kojom se ispituje osjetljivost bakterije *S. aureus* na antimikrobne tvari trenutno je najčešće korištena metoda za procjenu antibakterijske aktivnosti meda [43].

3.4. Metode određivanja antioksidacijskih svojstava meda

U istraživanjima antioksidacijske aktivnosti meda koriste se kombinacije različitih metoda kako bi dobiveni rezultati bili što potpuniji. U pokušaju standardizacije antioksidacijskih svojstava meda, Beretta i sur. primjenjuju kombinaciju spektrofotometrijskih i fluorimetrijskih metoda te kemometriju [44].

3.4.1. DPPH - metoda

DPPH metoda daje informaciju o reaktivnosti ispitivanog spoja sa stabilnim organskim slobodnim radikalom. Najčešće je korištena *in vitro* metoda za učinkovito određivanje antioksidacijske aktivnosti, koja se temelji na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. Zbog svog nesparenog elektrona DPPH jako apsorbira u vidljivom dijelu spektra (ljubičasta boja) pri valnoj duljini 517 nm. Na sobnoj temperaturi je ovaj radikal relativno stabilan, no u prisutnosti molekule antioksidansa (primanjem elektrona), radikal prelazi u neradikalni oblik koji daje žutu boju otopine. Nastali spoj ima smanjeni intezitet apsorpcije u vidljivom dijelu spektra (vrijednost reakcije može se izmjeriti spektrofotometrijski) [45].



Slika 10. Redukcija DPPH• antioksidansom.

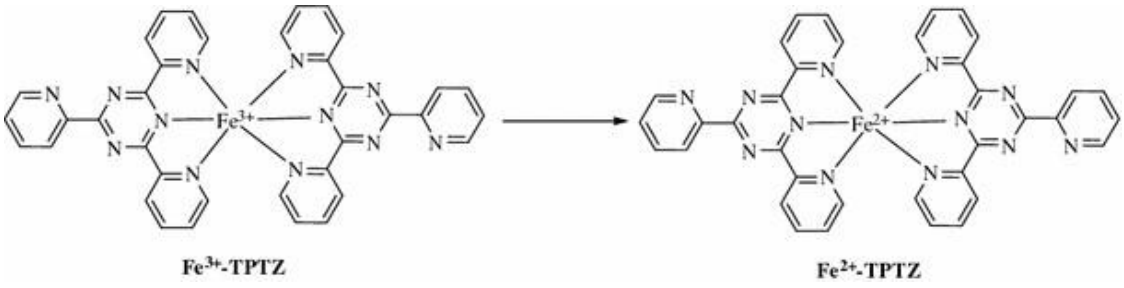
Antioksidacijska aktivnost uzorka se izračunava kao postotak gubitka signala (I%), prema jednadžbi:

$$I\% = \frac{AC_{(0)} - AA_{(t)}}{AC_{(0)}} \times 100$$

gdje je $AC_{(0)}$ apsorpcija otopine DPPH•, a $AA_{(t)}$ apsorpcija otopine radikala i uzorka meda u vremenu t [46].

3.4.2. FRAP metoda

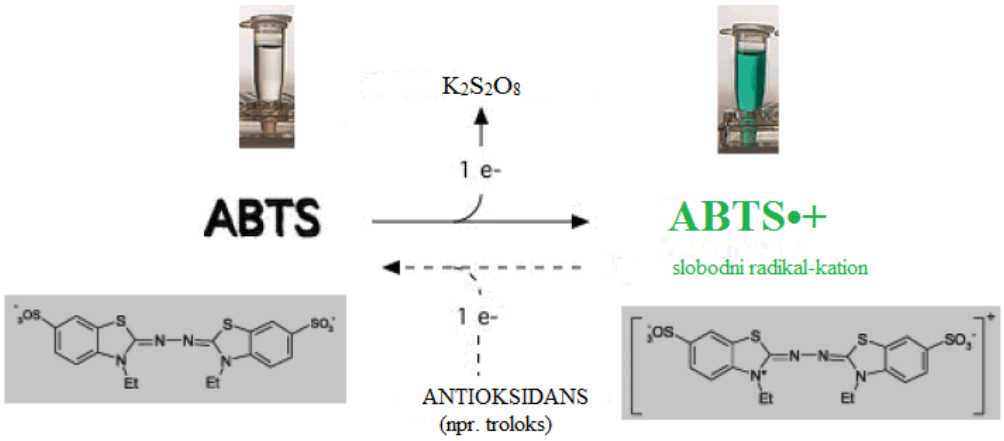
FRAP (eng. ferric reducing antioxidant power) kolorimetrijska metoda se temelji na sposobnosti ispitivanog antioksidansa da reducira kompleks željezovog iona, TPTZ (željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazin); iz feri (Fe^{3+}) u fero (Fe^{2+}) oblik. Vezanjem Fe^{2+} na ligand dolazi do intenzivnog mornarskog plavog obojenja pri 593 nm. Apsorpcijom se mjeri količina reduciranog Fe koji stoji u korelaciji s količinom antioksidansa. Troloks i askorbinska kiselina služe kao referentni spojevi. Rezultati se izražavaju kao μmol Fe^{2+}/mL uzorka [39, 47].



Slika 11. Reakcija redukcije željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ).

3.4.3. ABTS metoda

ABTS metoda se temelji na „gašenju“ plavo-zelenog ABTS radikal-kationa (radikal kation 2,2'-azinodi(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonske kiseline) koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Reakcijom ABTS-a s kalijevim persulfatom ($K_2S_2O_8$) nastaje kromoforni ABTS•+ radikal koji daje plavo-zelenu boju otopine s maksimumom apsorpcije na valnim duljinama od 415, 645, 734 i 815 nm. Dodatkom antioksidanasa u pripremljenu otopinu oni reduciraju ABTS•+ u ABTS čime se gubi obojenje. Razina obezbojenja odražava postotak inhibicije ABTS•+ radikala i određuje se kao funkcija koncentracije i vremena te uspoređuje sa standardom ekvivalenta. Ova metoda je primjenjiva za antioksidanse topljive u vodi i one topljive u mastima, čiste tvari i ekstrakte prehrambenih proizvoda [48].



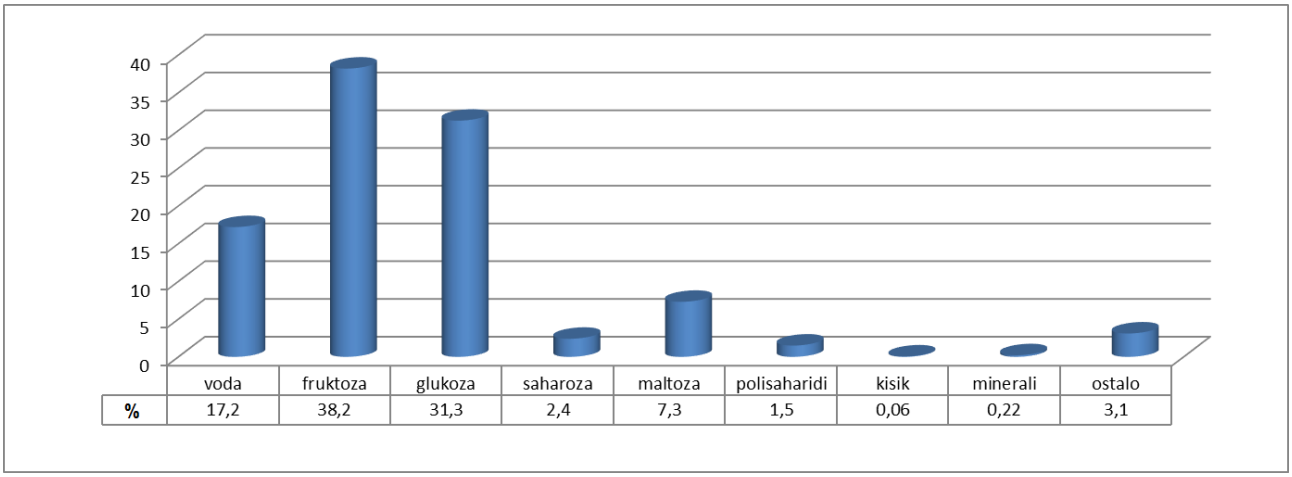
Slika 12. ABTS kemijska reakcija.

4. REZULTATI

4.1. KEMIJSKI SASTAV MEDA MANUKE

Med je prezasićena otopina šećera, čiji je sastav kompleksan zbog mnogobrojnih tvari prisutnih u malim koncentracijama. Udio tih tvari ovisi o botaničkom podrijetlu, klimi, okolišnim čimbenicima te ophođenju pčelara. Kvantitativno gledajući, osim šećera, ostale prisutne tvari kao što su aminokiseline, vitamini i minerali ne pridonose značajno prehrani. Graf 1. prikazuje prosječni sadržaj tvari u medu.

Graf 1. Prosječni sastav meda [49].



4.1.1. Voda

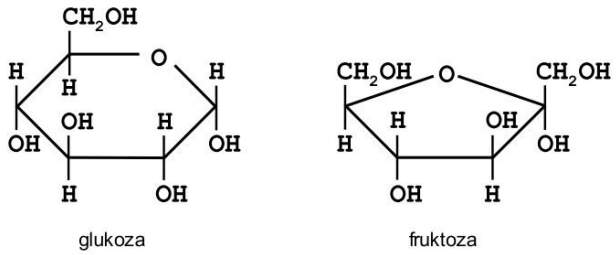
Tijekom zrenja meda u košnici dolazi do stalnog gubitka vode u medu. Zreo med sadrži ispod 18% vode [50]. Zakonski dopušten ukupni sadržaj vode je do 20% u nektarnom medu i medljikovcu te 23% u vrijeskovom medu. Aktivitet vode (mjera za prisutnu vodu) stoji u pozitivnoj korelaciji s rastom mikroorganizama. Osmotolerantni kvasci se također mogu pronaći u medu, a njihov rast potiče povećanje sadržaja vode. Ispod udjela vode od 17% ne postoji opasnost od fermentacije meda [51].

Pomoću refraktometra je utvrđeno da manuka med sadrži 17,8% vode [52].

Većina vrsta meda su newtonske tekućine, no med manuke ima tiksotropno svojstvo, što se povezuje s višim sadržajem proteina.

4.1.2. Ugljikohidrati

Najveći dio ugljikohidrata, ali i glavne tvari meda, su fruktoza (38%) i glukoza (31%), a prikazani su na Slici 13 [53]. Glukoza i fruktoza, kao i saharoza, potječu izravno iz nektara tj. medne rose, pri čemu udio pojedinog šećera ovisi o biljnom izvoru. Stoga je moguće na osnovi sadržaja monosaharida i trisaharida razlikovati nektarni med i medljikovac, no potrebni su i drugi parametri za određivanje botaničkog podrijetla meda.



Slika 13. Kemijska struktura šećera glukoze i fruktoze.

Identificirani su i disaharidi kao što su saharoza, maltoza, kojibioza te trisaharidi melecitoza i erloza. Većinom su to kombinacije spojeva glukoze i fruktoze.

Odnos sadržaja glukoze i sadržaja vode te prisutnost melecitoze određuju vjerojatnost kristalizacije meda. Smanjenje sadržaja fruktoze, a povećanje glukoze povećava kristalizaciju meda [54].

Manuka med sadrži 40% fruktoze i 36% glukoze [55]. Od oligosaharida je kao glavni spoj opisana maltoza. Identificirani su izomaltoza, kojibioza, turanoza i nigeroza, dok su saharoza, erloza i panoza prisutne u vrlo niskim koncentracijama. Na temelju sastava oligosaharida nije se mogla uočiti razlika između „aktivnog“ i „neaktivnog“ meda manuke [56].

4.1.3. Proteini

Sadržaj proteina u medu je nizak. Srednja vrijednost sadržaja proteina je 129 mg/100g meda [57], a može varirati od 58 do 786 mg/100g meda [58]. Općenito medljikovac sadrži više proteina od nektarnog meda.

U australskim medovima, elektroforezom je detektirano ukupno 19 proteina, koji su u med dospjeli iz dijelova biljke, posebno iz polena, što ukazuje na važnost biljnog podrijetla i kod sadržaja proteina. No veći dio proteina dolazi od pčele, stoga vrsta pčele utječe na spektar proteina. Najveći dio proteinske frakcije u medu čine enzimi, prikazani u Tablici 1. Pronađeni su i tzv. „major royal jelly proteins“ (MRJP) [59] i antibakterijski peptid, pčelinji defenzin-1 [60].

Najčešće istraživani enzimi su dijastaza i invertaza, pošto se koriste za procjenu eventualne termičke obrade. Dijastaza je α-amilaza koja potječe iz faringealnih žlijezda pčele. Invertaza je α-glukozidaza te također potječe iz pčele, ali poznato je do 18 njenih izoenzima[49]. Invertaza pokazuje hidrolitički i transglukozilacijski učinak, što objašnjava raznolikost oligosaharida u medu.

Glukoza oksidaza je odgovorna za oksidaciju glukoze, čime nastaju vodikov peroksid i glukonska kiselina. Što je med manje viskozan, to je veća njena aktivnost [61]. Katalaza razgrađuje vodikov peroksid u medu. Ovaj enzim dolazi iz nektara i polena u med te varijabilnost njene aktivnosti ovisi o botaničkom podrijetlu. Medljikovac pokazuje veću aktivnost katalaze.

U medu je prisutna i kisela fosfataza koja je od manjeg značaja za med i njegovo zrenje. Aktivnost meda se smanjuje povećanjem pH vrijednosti. Identificirani su još esteraza i proteolitički enzimi [62].

Tablica 1. Enzimi identificirani u medu, njihovo podrijetlo, temperaturni optimum njihovog djelovanja te učinak u medu [63].

Enzim	Podrijetlo	Temperaturni optimum (°C)	Učinak u medu
Dijastaza	pčela	40 - 55	-razgradnja škroba na maltozu -za određivanje pregrijanog meda
Invertaza	pčela	35 - 40	-pretvorba saharoze u glukozu i fruktozu -za dokazivanje pregrijanog meda
ß-Glukozidaza	pčela	40	-razgradnja složenih ugljikohidrata
Glukoza oksidaza	pčela		-nastajanje glukonske kiseline i vodikovog peroksida
Katalaza	biljka		-razgradnja vodikovog peroksida na vodu i kisik
Kisela fosfataza	biljka i pčela	37	-metabolizam šećera

U prosjeku manuka med ima dijastazni broj 10 koji odgovara normama (veći od 8), no pronađeni su i uzorci s dijastaznim brojem manjim od 3, što ne odgovara niti normama za enzimski slabije vrste meda (dijastazni broj veći od 3). Stoga se manuka med prema enzimskoj aktivnosti može uspoređivati s medom vrijeska, citrusnim i bagremovim medom.

Aktivnost invertaze u manuka medu je također niska, 22 U/kg, dok kod drugih vrsta meda varira od 13 do 217 U/kg. Aktivnost dijastaze i invertaze stoje u pozitivnoj korelaciji. Kvocijent aktivnosti invertaze i dijastaznog broja varira od 1,8 do 10 što pokazuje značajnu fluktuaciju enzimske aktivnosti manuka meda. Niska enzimska aktivnost, koja nije rezultat

termičke obrade meda, povezuje se s visokim sadržajem metilglioksala (MGO) u medu manuke [63].

4.1.4. Aminokiseline

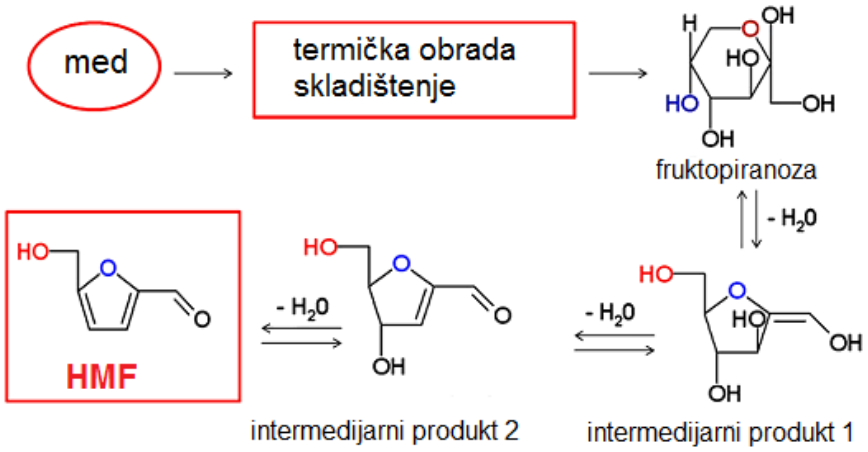
Prolin, koji potječe od pčele, čini najveći dio aminokiselina u medu od 50 do 85% [50]. Manuka med sadrži relativno visok udio prolina (71%) uspoređujući s nektarni medom i medljikovcem [63]. Druge aminokiseline potječu uglavnom iz nektara, odnosno medne rose, variraju u sastavu te se na temelju toga može zaključiti o botaničkom podrijetlu meda. Spektar aminokiselina može služiti kao dokaz patvorenja meda, pritom je kriterij prenizak sadržaj prolina koji ukazuje na nepotpuno zrenje ili patvorenje [64]. U literaturi se promatraju samo slobodne aminokiseline koje su zastupljene više u medljici. Osim prolina, u višim koncentracijama su identificirani fenilalanin, glutamin i asparaginska kiselina.

Tijekom skladištenja može doći do značajnog smanjenja ukupnog sadržaja aminokiselina, posebice arginina, glutamina, lizina i ornitina [65].

4.1.5. 5-Hidroksimetilfurfural

Karbonilni spoj 5-hidroksimetilfurfural (HMF) je tipični parametar za određivanje uvjeta skladištenja namirnica. Nastaje tijekom razgradnje šećera iz 3-deoksiglukozona (3-DG) ciklizacijom i odvajanjem vode. Jedan je od najpoznatijih međuprodukata Maillard-ove reakcije te je stoga marker za početak kvarenja namirnica. HMF može nastati pod utjecajem topline ili u kiselim uvjetima iz glukoze ili fruktoze [66]. Stoga se HMF može naći u namirnicama bogatima šećerom i blago kiselim, posebice pod djelovanjem više temperature.

Sadržaj HMF-a u medu varira od 1 do 75 mg/kg [67] te je parametar kvalitete. Koncentracije HMF iznad 40 mg/kg su neodgovarajuće, mogu ukazivati na predugo skladištenje ili zagrijavanje meda. Svježi med uglavnom ne sadrži HMF [54]. Iz navedenih razloga HMF je indikator za utjecaj skladištenja i topline [68].



Slika 14. Nastanak 5-hidroksimetilfurfurala u medu.

U izabranim komercijalnim uzorcima manuka meda je pronađeno od 3 do 43 mg/kg HMF-a [67]. U prisustvu veće frakcije slobodnih aminokiselina, 3-DG stupa u reakciju s aminokiselinama te je stoga manja frakcija 3-DG dostupna za pretvorbu u HMF. Međutim, ukoliko se u medu nalazi dihidroksiaceton (DHA), DHA reagira s aminokiselinama, umjesto 3-DG. Kao rezultat, veća frakcija 3-DG je dostupna za pretvorbu u HMF te stoga manuka med sadrži veći sadržaj HMF-a od drugih uspoređivanih vrsta meda [63].

4.1.6. Ostali produkti Maillard-ove reakcije

Drugi tipičan parametar skladištenja meda, osim HMF-a, kao i opći indikator rane faze Maillard-ove reakcije je **furozin**, koji nastaje iz Amadori produkta. Također je relevantan čimbenik kod prerade meda za neprikladno skladištenje i termičku obradu, kao i HMF [69].

U medu dolazi do stvaranja **melanoida** koji pridonose boji meda. To su polimeri od kompleksa proteina, polifenola i oligosaharida [70].

4.1.7. Ostale tvari

Med je slabo kiseo s pH koji varira od 3,4 do 6,1 [49]. U literaturi postoje različiti podaci za pH manuka meda, 4,21 [52] i 3,57 [71]. **Glukonska kiselina**, nastala pomoću glukoza oksidaze, je glavna kiselina u manuka medu. Druge organske kiseline, prisutne u nižim koncentracijama, su limunska, jabučna, mliječna, octena, maslačna i mravlja kiselina. Sveukupan udio organskih kiselina u medu je manji od 0,5%.

Medljikovac ima viši udio minerala od nektarnog meda. U manuka medu je identificirano 16 minerala, pritom **kalij** čini 87% sadržaja ukupnih minerala s 1290 mg/kg. Nadalje,

pronađeni su kalcij, magnezij, fosfor i sumpor. U usporedbi s drugim vrstama meda iz Novog Zelanda, manuka med sadrži najviše minerala, iako su razlike male [52].

Kvantitativno gledajući lipidi nisu od velikog značaja za med. Identificirane su masne kiseline i njihovi esteri, ugljikovodici, voskovi i steroli. Može biti prisutna i karakteristična hidroksi-masna kiselina iz matične mliječi, 10-hidroksidec-2-enska kiselina [72].

Velika je raznolikost hlapljivih spojeva u medu, a opisano je oko 600 spojeva što je ključno za aromatski profil pojedinih vrsta. Tvari **β-damascenon** i **fenilacetaldehid** daju miris i okus koji je karakterističan za med [49]. Osim biljnog utjecaja na aromu meda, postoje i čimbenici kao što su transformacija tvari pomoću pčela, termička obrada i onečišćenja. Hlapljivi spojevi manuka meda su opisani u poglavlju 4.1.11.

Fitokemikalije su tvari koje potječu iz biljaka, s kojih su pčele skupljale nektar ili mednu rosu, a pokazalo se kako mnoge od njih mogu povoljno utjecati na zdravlje čovjeka.

Analizom morfoloških karakteristika, kemotaksonomijskog profila eteričnih ulja i genetike populacije *L. scoparium*, moglo bi se ustanoviti da postoje par kemotipova na Novom Zelandu. Na temelju profila eteričnih ulja, u tipu 1 je visoki sadržaj eudezmola, u tipu 2 triketona, a u tipu 3 triketoni nisu bili prisutni.

Postoje četiri *L. scoparium* vrste: *L. scoparium var. incanum*, *var. linifolium*, *var. myrtifolium* i *var. triketone*. S obzirom na profil eteričnih ulja i morfologiju, tip 1 proizlazi iz *L. scoparium var. incanum* i *linifolium,* tip 2 iz *var. triketone*, a tip 3 iz *var. myrtifolium*.

Prevladavajući spojevi tipa 1 su 4-hidroksibenzojeva kiselina, dehidrovomifoliol i benzojeva kiselina; u tipu 2 su kojična kiselina, 2-metoksibenzojeva kiselina; u tipu 3 su siringinska kiselina, 4-metoksifenilmliječna kiselina i metil-siringat [73]. Najučestaliji spojevi determinirani u manuka medu prikazani su u Tablici 2.

Postoji korelacija između 2-metoksibenzojeve kiseline i MGO. Naime u tipu 2 meda manuke je pronađeno najviše MGO (634 mg/kg). Tip 3 med manuke je sadržavao značajnu količinu 4-metoksifenilmliječne kiseline, što može biti zbog kontaminacije kanuka medom, čija biljka cvate u isto doba kada i manuka biljka.

Zbog različitih metoda ekstrakcije i detekcije korištenih u kemijskoj karakterizaciji meda manuke, dobiveni literaturni podaci se ne mogu dosljedno uspoređivati.

Tablica 2. Najučestaliji spojevi identificirani u medu manuke [29].

Fenolne kiseline i flavonoidi	Druge tvari
kafeinska kiselina	fenilmliječna kiselina
izoferulična kiselina	4-metoksifenilmliječna kiselina
p-kumarinska kiselina	kojična kiselina
galna kiselina	5-hidroksimetilfurfural
4-hidrobenzojeva kiselina	2-metoksibenzojeva kiselina
siringinska kiselina	feniloctena kiselina
kvercetin	metil-siringat
luteolin	dehidrovomifoliol
8-metoksikemferol	leptosperin*
pinocembrin	glioksal
izoramnetin	metilglioksal
kemferol	3-deoksiglukozuloza
krizin	
galangin	
pinobanksin	

*ranije zvan leptosin

4.1.8. Antioksidansi

Antioksidansi su tvari koje moduliraju stvaranje slobodnih radikala te tako štite dijelove stanice od njihovog štetnog djelovanja.

U medu mogu biti enzimski (katalaza, glukoza oksidaza) i neenzimski (organske kiseline, produkti Maillard-ovih reakcija, aminokiseline, proteini, flavonoidi, fenoli, vitamin E, vitamin C, karoteonidi) [74]. Kao izvori neenzimskih antioksidanasa služe mnoge fitokemikalije prisutne u medu, a njihova količina ovisi prvenstveno o njegovom botaničkom podrijetlu.

U usporedbi s drugim vrstama meda, kojima se također pripisuje visoki antioksidacijski potencijal (npr. heljdin i bagremov med), manuka i heljdin med su imali znatno veći učinak hvatača slobodnih radikala od bagremovog meda. Međutim samo manuka med je imao specifičnu antioksidacijsku aktivnost na superoksid anion radikale što se pripisuje metil-siringatu (MSYR) [75]. Manuka med pokazuje i najviše vrijednosti u sadržaju fenolnih spojeva i antioksidacijskog kapaciteta.

4.1.9. Polifenoli

Flavonoidi su sekundarni metaboliti biljaka, široko rasprostranjena heterogena i jedna od najvažnijih skupina prirodnih antioksidanasa. Nalaze se u mnogim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću. Posjeduju antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnost [76]. Osim toga djeluju protuupalno, antiproliferativno, antimikrobno te korisno za kardiovaskularni sustav [77].

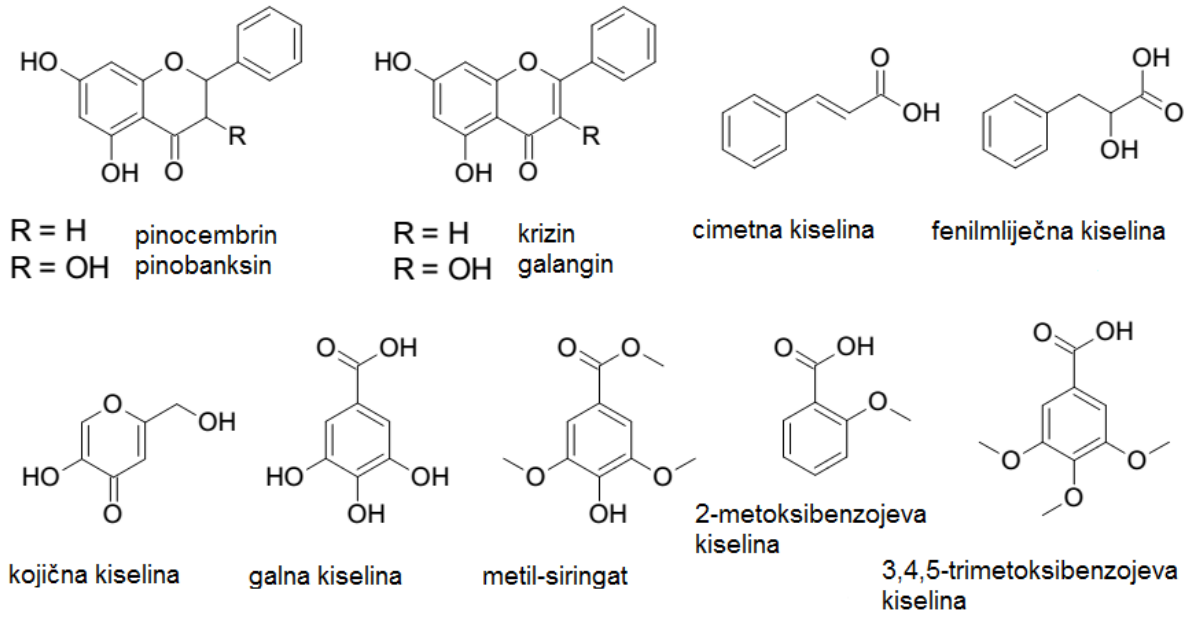
Antioksidacijska aktivnost je prvenstveno rezultat njihove sposobnosti donora vodikovih atoma, stoga uklanjaju slobodne radikale uz formiranje fenoksil-radikala, koji je stabiliziran rezonancijom te postaje manje reaktivan.

Pčele medarice putem nektara, polena i medljike donose u košnicu polifenole, koji su zaslužni za njegove ljekovite osobine. Njihov broj i količina koji se mogu naći u medu variraju u odnosu na čitav niz faktora; kvaliteta pčelinje paše, sezona sakupljanja meda, geografsko područje [93]. Flavonoidi i fenolne kiseline su najzastupljeniji te različite vrste meda sadrže često slične polifenole, ali kvantitativno se razlikuju.

U usporedbi s medom od bagrema i divlje mrkve, manuka med ima najviši ukupni sadržaj polifenola s 899,09 ± 11,75 mg ekvivalenta galne kiseline/kg [78]. Galna kiselina se često navodi kao glavna fenolna kiselina meda manuke. Povišene razine trimetoksibenzojeve i 2-metoksibenzojeve kiseline te metilglioksala su pronađene u manuka medu. Prema drugim istraživanjima ukupni sadržaj polifenola u medu manuke se kretao od 43,0 do 270,6 mg GE/100g (GE – ekvivalenti galne kiseline) [79].

Kod *Leptospermum* meda Novog Zelanda i Australije pronađeni su: miricetin, kvercetin, luteolin, kemferol, kemferol-8-metil-eter, pinocembrin, krizin, galna, elaginska, klorogenska, kafeinska, *p*-kumarinska, ferulinska i siringinska kiselina[80].

Prema Yao et al. najučestaliji flavonoidi meda manuke su: kvercetin, izoramnetin, krizin, luteolin i nepoznati flavanon [80]. U drugim analizama pronađeni su i metil-siringat, cimetna kiselina, pinobanksin, pinocembrin, galangin, fenilmliječna kiselina, *o*-metoksiacetofenon i grupa metoksibenzojevih kiselina [79, 81].



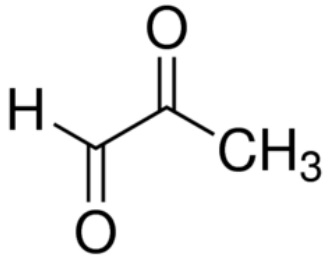
Slika 15. Izabrane strukture flavonoida i fenolnih kiselina meda manuke [63].

Kvalitativne i kvantitativne razlike u sastavu flavonoida manuka meda određenih u različitim istraživanjima moguće su posljedica primjenjenih različitih metoda ekstrakcije i detekcije. Ovo je ograničavajući čimbenik u uspoređivanju dostupnih literaturnih podataka [29].

4.1.10. 1,2-Dikarbonilni spojevi

Glioksal (GO), 3-deoksiglukozon (3-DG) i metilglioksal (MGO) su 1,2-dikarbonilni spojevi pronađeni u medu manuke, odgovorni za neperoksidnu antibakterijsku aktivnost. Naspram ostalih vrsta meda, u medu manuke su pronađene visoke količine MGO-a koje variraju od 38 do 761 mg/kg [67] te 38 do 828 mg/kg [82], što je i do 100 puta više nego u konvencionalnim vrstama meda (1,6 do 24 mg/kg).

Osim manuka meda i druge vrste *Leptospermum* meda pokazuju visoku koncentraciju MGO; posebno „jellybush“ med do 2400 mg/kg [83].



Slika 16. Kemijska struktura metilglioksala.

Navedeni spojevi su izolirani i identificirani HPLC-om na obrnutim fazama (RP-HPLC), s fotodiodnim detektorom (eng. photodiode array - PDA) i spektrometrijom masa (eng. mass spectrometry – MS) [67, 82].

4.1.11. Cvjetni markeri meda manuke

Određivanjem kemijskih markera tipičnih za određene vrste meda, utvrđuje se botaničko ili cvjetno podrijetlo meda, koji s kemijskim sastavom određuju kvalitetu te mogu poslužiti kao „fingerprint“ meda. Kako se smatra da je manuka med medicinski proizvod od posebnog značaja zbog svoje antimikrobne aktivnosti, izuzetno je bitno autentificirati njegovo botaničko podrijetlo. Flavonoidi, fenolne kiseline i izoprenoidi najprikladniji su za diferencijaciju monoflornih vrsta meda.

Markeri manuka meda su spojevi koji su pronađeni isključivo u manuka medu, u znatno višim koncentracijama ili definiraju profil manuka meda [73].

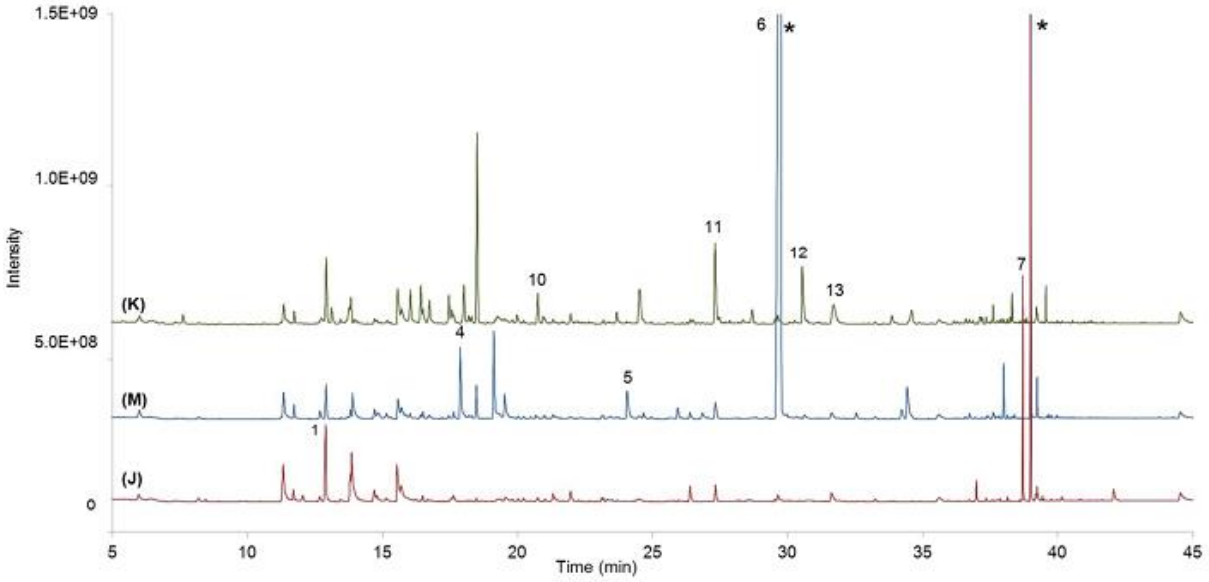
4.1.11.1. Hlapljivi spojevi

Usporedbom manuka, kanuka i „jellybush“ vrsta meda uočavaju se razlike u sastavu hlapljivih spojeva [84]; prikazano u Tablici 3. Međusobne razlike se očituju po tome što se navedeni spojevi isključivo nalaze u jednom od prikazanih vrsta meda, imaju najveći intenzitet pika u kromatogramu nekog od vrsta meda ili su prisutni u vrlo malim količinama u drugim vrstama meda (npr. 2'-metoksiacetofenon karakterističan za manuka med, ali je prisutan u malim količinama i u „jellybush“ medu).

Tablica 3. Hlapljivi spojevi kao mogući markeri manuka, kanuka i „jellybush“ vrsta meda.

Manuka med (*Leptospermum scoparium*)	**Kanuka med** (*Kunzea ericoides*)	**„Jellybush“ med** (*Leptospermum polygalifolium*)
2-metilbenzofuran (4) 2'-hidroksiacetofenon (5) 2'-metoksiacetofenon (6)	2,6,6-trimetilcikloheks-2-en-1,4-dion (10) fenetilni alkohol (11) *p*-anisaldehid (12) neidentificirani spoj (13)	*cis*-linalool oksid (1) 3,4,5-trimetilfenol (7)

*brojevi u zagradama označavaju broj pika na Slici 17.



Slika 17. HS-SPME-GC/MS profili: usporedba čistih kanuka (K), manuka (M) i „jellybush“ (J) vrsta meda [84].

Za izolaciju hlapljivih spojeva najčešće se koriste metode ekstrakcije; mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME), analiza vršnih para iznad otopine meda s metodomn mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (HS-SPME), Likens-Nickerson (simultana destilacija-ekstrakcija), ultrazvučna ekstrakcija otapalom (USE). Plinska kromatografija (GC) i plinska kromatografija - masena spektrometrija (GC/MS) se upotrebljavaju u analizi hlapljivih spojeva [85, 86].

4.1.11.2. Nehlapljivi spojevi

Flavonoidni profil manuka meda većinom čine kvercetin (13,8%), izoramnetin (12,9%), nepoznati flavonoid (12,7%), krizin (12,6%) i luteolin (12,6%); zajedno čine 64,6% ukupnih flavonoida (3,06 mg/100 g meda). Australski „jellybush“ (*L. polygalifolium*) i manuka (*L. scoparium*) med sadrže sličan i relativno stabilan flavonoidni profil, što bi moglo poslužiti kao cvjetni marker *Leptospermum* vrsta meda koji se proizvode u oceanijskom području. Glavna razlika je u ukupnom sadržaju flavonoida; manuka med posjeduje viši udio 3,06 mg/100g, a australski „jellybush“ med niži 2,22 mg/100g.

Manuka med sadrži najzastupljeniju frakciju **fenolnih kiselina**, naspram drugih vrsta meda, s 14,0 mg/100g meda. Najviši udio čini galna kiselina (50%), a sekundarne fenolne kiseline meda manuke čine nepoznata fenolna kiselina (11,9%), elaginska kiselina (10,8%) i kafeinska kiselina (10,4%). Fenolni profil bi se mogao koristiti kao cvjetni marker manuka meda, na temelju dominirajuće galne kiseline. Glavna razlika između australskog i meda s

Novog Zelanda je u ukupnoj frakciji fenolnih kiselina i galne kiseline (znatno viši u manuka medu) te u kumarinskoj kiselini (niža u manuka medu), što bi moglo poslužiti u razlučivanju tih dviju *Leptospermum* vrsta [80].

Apscizinska kiselina je fitohormon koji inhibira mijenu tvari, pomaže biljci da preživi u stresnim uvjetima te kontrolira završne razvojne stadije biljke (starenje, otpadanje listova, uvenuće cvjetova ili dozrijevanje plodova).

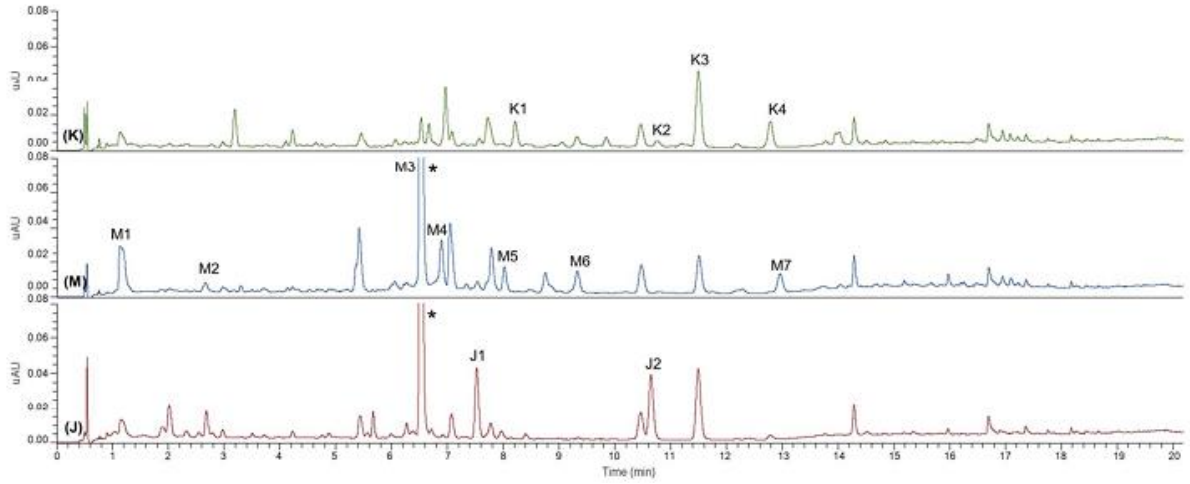
Nalazi se u obje *Leptospermum* vrste meda, gdje dominira zajedno s **galnom kiselinom**, te bi mogli služiti za diferencijaciju *Leptospermum* od ostalih vrsta meda. Sama apscizinska kiselina bi se mogla koristiti kao biljni marker manuka meda. Naime manuka med sadrži znatno više navedene kiseline (32,8 mg/100 g meda) od australskog „jellybush" meda (7,83 mg/100g meda). Potrebne su daljnje studije na više uzoraka manuka meda kako bi se apscizinska kiselina potvrdila kao biomarker [80].

S obzirom na nehlapljive spojeve manuka, kanuka i „jellybush" vrste meda, uspoređivanjem njihovih fotodiodnih (PDA; $\lambda = 254$ nm) profila može se uočiti jasna razlika u kemijskom sastavu (Tablica 4.). Navedeni spojevi mogu se pojaviti i u europskim i drugim vrstama meda Novog Zelanda, ali u manjim količinama.

Tablica 4. Nehlapljivi spojevi kao mogući biomarkeri manuka, kanuka i „jellybush" vrsta meda.

Manuka med (*Leptospermum scoparium*)	**Kanuka med** (*Kunzea ericoides*)	**„Jellybush" med** (*Leptospermum polygalifolium*)
leptosperin (M3) lepteridin* acetil-2-hidroksi-4-(2-metoksifenil)-4-oksobutanoat (M5) 3-hidroksi-1-(2-metoksifenil)-penta-1,4-dion (M6) kojična kiselina (M1) 5-metil-3-furankarboksilna kiselina (M2) M4 i M7**	4-metoksifenilmliječna kiselina (K1) metil-siringat (K3) *p*-anizinska kiselina (K2) lumikrom (K4)	2-metoksibenzojeva kiselina (J1) J2**

*pronađen i identificiran u kasnijim istraživanjima [89, 90, 150]
**neidentificirani biomarkeri ***slova i brojevi u zagradama označavaju pik na Slici 18.



Slika 18. UHPLC-PDA-MS/MS profili (254 nm): usporedba čistih kanuka (K), manuka (M) i „jellybush“ (J) vrsta meda [84].

Senanayake et al. su podijelili uzorke meda manuke na aktivne i inaktivne na temelju UMF (eng. unique manuka factor) sadržaja. Inaktivni su imali veći udio 4-metoksifenilmliječne kiseline i metil-siringata od aktivnih vrsta meda [87]. Na temelju prethodno navedenih rezultata, kanuka med, koji ne posjeduje neperoksidnu antibakterijsku aktivnost, moguće čini veći udio u inaktivnom medu. To se podudara i s rezultatima navedenim na početku poglavlja; prema Oelschlagel et al. grupa 2 je čisti manuka med, grupa 3 uključuje med s višim udjelom kanuka meda, a med grupe 1 vjerojatno sadrži samo mali udio i manuka i kanuka meda [73]. Lumikrom služi kao kriterij razlikovanja u usporedbi manuka i kanuka meda zbog svoje karakterističnosti za kanuka med (karakterističan je za kanuka med).

Metil-siringat se nalazi u visokim konentracijama u medu manuke, ali u medu kanuke čak i u višim koncentracijama, stoga nije pouzdan kemijski marker meda manuke [84]. Osim toga ne korelira s neperoksidnom aktivnošću ovog meda.

Dihidroksiaceton (DHA) koji konvertira neenzimski i ireverzibilno u **metilglioksal (MGO)** prisutni su u nektaru meda manuke te su navedeni kao njegovi biomarkeri. Međutim koncentracija ovih spojeva nije stabilna tijekom trajanja meda te stoga nisu pouzdani kemijski markeri [88].

Novije otkriće dvaju fluorescencijskih valnih duljina jedinstvenih za med manuke, **MM1** (na 270-365 nm) i **MM2** (na 330-470 nm), predstavlja brži, jeftiniji i učinkovitiji način autentifikacije koristeći fluorescentnu spektrometriju [89]. MM1 fluorescentni marker koji je evidentan na 270-365 nm ekscitacijske emisije spoja, dobivenog iz *Leptospermum* nektara je

leptosperin [90], a MM2 evidentan na 330-470 nm je **lepteridin**. Oba su stabilna tijekom dužeg skladištenja meda te su stoga pouzdani kemijski markeri meda manuke.

Najčešće korištena metoda izolacije fenolnih spojeva je ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE), a analiziraju se uglavnom GC-om i HPLC-om [91]. Koriste se i tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC) s fotodiodnim detektorom (PDA) i/ili s masenom spektrometrijom (MS).

4.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST MEDA MANUKE

4.2.1. Antioksidacijska aktivnost

Ustanovljeno je da med sadrži značajnu količinu antioksidanasa, koja se mjeri kapacitetom meda za vezanje i uklanjanje slobodnih radikala. Osim toga med pokazuje i drukčiji mehanizam; inhibiranje nastanka slobodnih radikala. Nastali superoksid je relativno nereaktivan, konvertira u vodikov peroksid koji je znatno manje reaktivan, no iz njega nastaje izuzetno reaktivni peroksidni radikal. Taj nastanak kataliziran je metalnim ionima (željezo, bakar) te spajanje tih metalnih iona u komplekse s organskim molekulama je bitan antioksidacijski obrambeni mehanizam [92]. Za sprječavanje navedenih reakcija odgovorni su flavonoidi i drugi polifenoli, koje med manuke sadrži u višim koncentracijama, nego druge vrste meda.

Antioksidacijski potencijal meda stoji u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem vode i bojom meda. Što je med tamniji, to sadrži više antioksidanasa. Bitni su i botaničko podrijetlo i eksterni faktori kao što su klimatski uvjeti, okolišni čimbenici, procesiranje i skladištenje meda [93].

Zbog svojih relevantnih bioloških karakteristika, u istraživanjima se manuka med često koristi kao „zlatni standard“ kod određivanja antioksidacijskog kapaciteta različitih vrsta meda. Osim toga pokazuje zaštitnu ulogu protiv oksidacijskog oštećenja smanjujući oštećenje DNA, sadržaj malondialdehida i aktivnost glutation peroksidaze u jetri. To se događa moguće posredstvom modulacije antioksidacijskih enzima (npr. katalaze) i visokog antioksidacijskog kapaciteta zbog relevantnog sadržaja fenola [94].

4.2.2. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna efikasnost meda ovisi o više čimbenika: polifenoli, pH meda i pH područja koje se tretira (npr. rana), defenzin-1, H_2O_2, te u slučaju meda manuke sadržaj MGO. Ova kombinacija različitih puteva „napada“ na bakterije je najvjerojatnije zaslužna za nemogućnost razvoja rezistencije bakterija na med, za razliku od brze indukcije rezistencije konvencionalnih jednokomponentnih antibiotika. Smanjena osjetljivost bakterija na manuka med tijekom dužeg perioda primjene je uočena, ali ta pojava nije dugoročna i nisu pronađene mutirane rezistentne bakterije. Rizik je nizak ukoliko se med primjenjuje kroz duži period u visokim koncentracijama [95].

Vodikov peroksid (H_2O_2), nastao pomoću enzima glukoza oksidaze, je bitan za antimikrobni potencijal meda koji se koristi za tretiranje kože, infekcije mekog tkiva, inficiranih rana, u eradikaciji patogenih bakterija u gornjem respiratornom traktu ili *H. pylori* u želucu. Međutim enzim katalaza iz tjelesnih tekućina ga inaktivira. Dodavanjem katalaze u uzorke različitih vrsta meda, antimikrobno djelovanje se ne može detektirati, jedino je manuka med, skupa s *Echium vulgare* medom pokazao antimikrobni učinak na značajnom broju uzoraka na temelju svoje neperoksidne aktivnosti [43].

MGO je dominantni bioaktivni spoj manuka meda te koncentracija od 150 mg/kg je odgovorna za antibakterijski učinak, poznat kao neperoksidna aktivnost (NPA). Dokazana je dobra linearna korelacija MGO-a i antibakterijske aktivnosti [96]. Njegova ukupna antibakterijska aktivnost može se mjeriti MGO koncentracijom u medu ili UMF vrijednošću (*eng.* unique manuka factor = jedinstveni manuka faktor) koja je određena u marketinške svrhe kako bi se klasificirali proizvodi (Tablica 5). Visina UMF-a i cijena meda stoje u pozitivnoj korelaciji.

Vrijednost UMF specificira antibakterijsku aktivnost izraženu kao ekvivalent koncentracije otopine fenola (% w/v) [95]. Određen je naziv „aktivni manuka med“ koji označuje manuka med s neperoksidnom aktivnošću, kako bi se razlikovao od drugih vrsta meda koji se prodaju kao manuka med, a nemaju tu aktivnost.

Tablica 5. Klasifikacija proizvoda po njihovom udjelu MGO i vrijednosti UMF.

Proizvod	**Metilglioksal (MGO)**, mg/kg	**UMF** (NPA ekvivalent koncentracije otopine fenola)
MGO™ 100+ Manuka	100	10+
MGO™ 250+ Manuka	250	15+
MGO™ 400+ Manuka	400	20+
MGO™ 550+ Manuka	550	25+

Manuka med je pokazao antimikrobni učinak na opsežan broj bakterija uključujući bakterije rezistentne na prvu liniju antibiotika. Bakterije osjetljive na manuka med prikazane su u Tablici 6.

Tablica 6. Mikroorganizmi osjetljivi na manuka med [55].

Gram pozitivne bakterije	**Gram negativne bakterije**
Streptococcus pyogenes	*Stenotrophomonas maltophilia*
koagulaza negativni stafilokoki	*Acinetobacter baumannii*
meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA)	*Salmonella enterica serovar Typhi*
Streptococcus agalactiae	*Pseudomonas aeruginosa*
Staphylococcus aureus	*Proteus mirabilis*
koagulaza-negativni *Staphylococcus aureus* (CONS)	*Shigella flexneri*
hemolitički steptokoki	*Escherichia coli*
Enterococcus	*Enterobacter cloacae*
Streptococcus mutans	*Shigella sonnei*
Streptococcus sobrinus	*Salmonella typhi*
Actinomyces viscosus	*Klebsiella pneumonia*
	Burkholderia cepacia
	Helicobacter pylori
	Campylobacter spp.
	Porphyromonas gingivalis

Oralna primjena manuka meda je limitirana pošto se šećeri u medu brzo apsorbiraju, a MGO brzo razgrađuje reagirajući s drugim sastojcima u hrani, stoga se traže oblici veće stabilnosti i učinkovitosti. Kompleksiranjem manuka meda s α-ciklodekstrinom (prirodni ciklički oligosaharid), nazvan „Manuka Honey with CycloPower“, zadržan je antibakterijski učinak te pokazan uglavnom povećan bakteriostatski i mogući baktericidni učinak na Gram pozitivne i Gram negativne patogene. Pretpostavlja se da je ovaj ishod rezultat produženog oslobađanja antimikrobnih komponenti kako bi se održala bakteriostatska koncentracija kroz duži period.

Mogući je i sinergistički učinak α-ciklodekstrina i drugih sastojaka manuka meda, no potrebna su daljnja istraživanja za ovu postavku [97].

Dokazana je prisutnost antimikrobnih spojeva u medu manuke, kada se neutraliziraju H_2O_2, MGO, defenzin-1 i titrira med do neutralnog pH. Nakon neutralizacije manuka med je zadržao baktericidnu aktivnost na *B. subtilis*, meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), *E. coli* i *P. aeruginosa* [98].

4.2.3. Tretiranje rana

Med karakterizira više svojstava koja pridonose u zacjeljivanju rana, a uključuje antibakterijski, antioksidacijski, antiinflamatorni, keratolitički, deodorirajući učinak, održavanje ranom vlažnom, služi kao zaštitna barijera te ubrzava rast tkiva. Med za navedenu indikaciju mora biti medicinski ispravan med, podvrgnut gama zračenju tako da se eradiciraju bakterijske spore koje mogu biti prisutne u sirovom medu. Neophodna je proizvodnja u kontroliranim higijenskim uvjetima, poznavanje sastava i standardizacija antibakterijske aktivnosti [60, 99].

Nakon izlaganja izolata rane inhibitornim koncentracijama manuka meda, rezistentne bakterije *(E. coli*, MRSA, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*) nisu pronađene [95, 99]. Mogući razlog eradikacije (potpunog iskorjenjenja uzročnika zarazne bolesti) rezistentnih bakterija su razlike u sadržaju glavnih antimikrobnih sastojaka meda, MGO i H_2O_2, koji variraju s botaničkim i geografskim podrijetlom nektara, vremenom i uvjetima skladištenja meda. Anti-biofilm aktivnost je bila najviša u mješavini meda s najvećim udjelom manuka meda; učinkovitost različitih vrsta manuka meda je rasla proporcionalno sa sadržajem MGO, iako isti udio MGO s ili bez šećera, nije mogao eradicirati biofilmove. Stoga se pretpostavlja da su i drugi čimbenici u manuka medu odgovorni za potentnu anti-biofilm aktivnost [55].

Uočena je sinergistička kombinacija meda manuke s antibioticima koji se koriste kod inficiranih rana uzrokovanih bakterijama rezistentnima na mnoge antibiotike, kao što je MRSA. Antibiotici (tetraciklin, rifampicin, mupirocin, imipenem), koji su pokazali sinergistički učinak, dolaze iz različitih grupa antibiotika, stoga s različitim mehanizmima (na 30S ribosome, RNA polimerazu, membranu i staničnu stjenku). Ta činjenica ukazuje na kompleksnost sastojaka meda manuke s moguće više djelatnih tvari koje ostvaruju učinak na više ciljnih mjesta u stanici [100, 101].

Za antiseptičko djelovanje zavoja s medom odgovorna je i antimikrobna aktivnost vodikovog peroksida. Nastanak H_2O_2 varira disproporcionalno pri razrjeđenju meda te razrjeđenje zavoja s medom varira s eksudatom (izljev tekućine i staničnih elemenata iz kapilara ošte-

ćenih pri upali) rane, stoga je bitno ustanoviti nastanak H_2O_2 u različitim koncentracijama meda. Maksimalni sadržaj akumuliranog H_2O_2 (1-2 mmol/L) bio je u otopini meda koncentracije 30% i 50% (v/v) što je ekvivalentno 10 cm x 10 cm zavoja koji sadrži 20 mL meda razrijeđenog s 10 do 113 mL eksudata rane [102]. Sadržaj nastalog H_2O_2 je vrlo nizak naspram konvencionalno primjenjivanog sadržaja te je stoga rizik od nekroze stanica (odumiranje stanica u živim tkivima) vrlo nizak.

Rane i ulceracije (duboki defekti na koži i u potkožnom tkivu) koje nisu reagirale na konvencionalne pripravke, pokazale su značajno poboljšanje topikalnom (lokalnom) primjenom meda manuke. Rane koje su na početku bile sterilne ostale su sterilne sve do zacjeljenja, a inficirane rane i ulkusi postali su sterilni unutar tjedan dana. Med je uklanjao odumrlu kožu i zamijenio ju granuliranim tkivom, ubrzao epitelizaciju te apsorbirao edem oko rubova ulkusa [103].

Mikroorganizmi koji koloniziraju opekotinu potječu iz pacijentove gastrointestinalne i respiratorne flore, dubljih slojeva kože ili kontaminiranih vanjskih izvora (tlo, voda, zrak). Topikalnom primjenom meda brzo se čisti inficirana rana, ubrzava proces zacjeljivanja dubokih inficiranih kirurških rana. Nadalje, kod opekotine med smanjuje površinu rane, djeluje antimikrobno te ponovno epitelizira, djeluje brže od konvencionalnih pripravaka. Protuupalnim učinkom med smanjuje oštećenje uzrokovano slobodnim radikalima te tako prevenira daljnju nekrozu tkiva.

4.2.4. Citotoksična aktivnost

Citotoksičnost je inaktivacija i ubijanje stanice ometanjem njenih fizioloških funkcija određenim tvarima. Može biti reverzibilno ograničenje stanice ili ireverzibilno oštećenje (smrt) pri čemu su sve funkcije i strukture potencijalni ciljevi napada na stanicu. Toksični učinak se može manifestirati i kao promjena veličine stanice, proliferacija stanica ili povećana akumulacija određenih tvari [63].

Med manuke je pokazao potentni antiproliferativni učinak na melanomu, kolorektalnom karcinomu i karcinomu dojke, koji ovisi o vremenu i dozi meda. Glavni mehanizam antiproliferativnog djelovanja med ostvaruje aktivacijom mitohondrijskog apoptotičnog puta, stimuliranjem inicijatora kaspaze-9, koja određuje aktivaciju izvršitelja, kaspaze-3. Nadalje, inducira apoptozu aktivacijom PARP, indukcijom fragmentacije DNA i gubitkom ekspresije Bcl-2 [29].

Uočeno je da med može ublažiti nuspojave onkoloških tretmana. Nakon radikalnog odstranjivanja vulvarnog karcinoma, med je pomogao u bržem zacjeljenju rana [104]. Može smanjiti radijacijom inducirano oštećenje crijeva u tretmanu karcinoma maternice [105]. Zabilježena je učinkovitost meda kod mukozitisa izazvanog radijacijom te radioterapijom i kemoterapijom izazvanih kožnih reakcija [106].

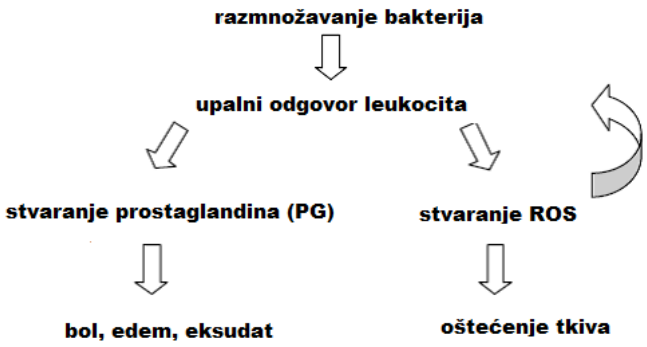
Topikalna primjena manuka meda preporuča se kod kemoterapijom induciranog oralnog stomatitisa. Kao suportivna terapija s kemoterapeuticima doprinosi boljoj učinkovitosti kod kemoterapijom inducirane febrilne neutropenije; smanjio je potrebu za faktorima stimulacije kolonija (CSF) [107]. Medni oblozi pomažu kod pacijenata s melanomima nakon što uobičajeni pristupi (terapija zračenjem) nisu pokazali učinak [108].

4.2.5. Imunostimulacijska aktivnost

Osim izravnog antimikrobnog djelovanja, med potpomaže borbu s infekcijama poticanjem rada imunološkog sustava. Med stimulira limfocite T i B koji posljedično aktiviraju neutrofile. Stimulacijom monocita *in vitro* dolazi do oslobađanja citokina TNF-α, IL-1 i IL-6 koji djeluju kao glasnici upale i aktiviraju mnoge aspekte imunološkog odgovora. Osiguravanjem zaliha glukoze med omogućava povećano stanično disanje makrofaga koji proizvode vodikov peroksid, a osiguravanjem supstrata za glikolizu makrofazima je omogućena proizvodnja energije čak i unutar oštećenih tkiva sa smanjenom opskrbom kisika. Postoje pretpostavke o ulozi kiselosti meda u potpomaganju fagocitoze jer fagocitne vakuole u makrofazima imaju kiseli pH pomoću kojeg se fagocitirane bakterije uništavaju [92].

4.2.6. Antiinflamatorna aktivnost

Upala je neophodan dio normalnog odgovora na infekciju ili ozljedu, ali ako je prejaka ili kroz duži vremenski period prevenira zacjeljivanje i uzrokuje daljnja oštećenja. Upalni odgovor nastao djelovanjem bakterija prikazan je na Slici 19. Leukociti u upali stvaraju glasnike koji reguliraju okolno područje, prostaglandine (PG), koji su odgovorni za bolne simptome upale. Dolazi do vazodilatacije, pucanja stijenki kapilara te istjecanja plazme što uzrokuje oticanje okolnog tkiva, eksudata. Dogotrajna upala potiče i stvaranje slobodnih radikala u tkivu koji mogu razgraditi lipide, proteine i nukleinske kiseline, čime nastaje erozija tkiva. Slobodni radikali prekomjerno aktiviraju fibroblaste, stoga dolazi do fibroze (prekomjerno formiranje vlaknastog vezivnog tkiva u organu ili u tkivu tijekom reaktivne faze ili faze obnavljanja tkiva) [92].



Slika 19. Upalni odgovor na bakterijsku infekciju.

Protuupalni učinak meda manuke se uglavnom odnosi na rane i opekline, ali i na GIT, što je opisano u poglavljima 4.2.3., 4.2.7., 5.4.3. i 5.4.5.

4.2.7. Primjena u gastroenterologiji

4.2.7.1. Dijareja

Skraćivanje trajanja dijareje primjenom meda pripisano je antibakterijskoj aktivnosti meda, što objašnjava neučinkovitost meda na dijareju uzrokovanu virusom. Med nije niti povećao trajanje dijareje uzrokovane virusom, za razliku od terapije antibioticima.

Standardno liječenje dijareje uključuje rehidraciju te nadomjestak elektrolita izgubljenih dijarejom, oralno ili intravenski. Primjenjivane ORS (oralna rehidracijska otopina) sadrži otopinu elektrolita s dodanom glukozom koja potpomaže apsorpciju elektrolita i povećava reapsorpciju vode u crijevima. Zamjenom glukoze s medom u ORS-u, med je bio jednako učinkovit u rehidraciji pacijenata [109]. Prednost meda je što sadrži fruktozu koja dodatno povećava reapsorpciju vode s manje natrija te povećava apsorpciju kalija, za razliku od glukoze koja uzrokuje gubitak kalija [110].

4.2.7.2. Peptički ulkus i gastritis

Najčešći uzročnik peptičkog ulkusa je bakterija *H. pylori*, a drugi uzročnici mogu biti lijekovi (nesteroidni antiinflamatorni lijekovi - NSAIL), alkohol i stres. U *in vitro* studijama inhibirana je *H. pylori* s 20%-tnom otopinom meda [111]. Koncentracija meda manuke od 5% potpuno je inhibirala rast bakterije, no kliničkim istraživanjem bakterija nije bila uklonjena nakon dva tjedna terapije s dozom od četiri žlice meda na dan (25g) [112]. Moglo bi se zaključiti da med u ovim indikacijama ne djeluje eradikacijom *H. pylori*, no potrebna su daljnja istraživanja na većem broju ljudi, kroz duži period i većom dozom.

Istraživanjem na štakorima pokazalo se da davanje meda 30 minuta prije konzumacije alkohola štiti od ulceracija uzrokovanih alkoholom. Istovremena primjena meda s indometacinom preveniralo je ulceracije [113].

Davanjem 30 mL meda tri puta dnevno prije jela značajno se smanjio pobol od dispepsije, gastritisa, dudodenalnog ulkusa te pojave krvi u stolici [114].

4.2.7.3. Poboljšanje probave i apsorpcije

Med sadrži enzime koji poboljšavaju probavljanje hrane, posebno ugljikohidrata kao što su šećeri i škrob. Jednostavne molekule šećera u medu mogu se direktno apsorbirati u krvotok.

Probiotici su živi nepatogeni mikrobiološki suplementi koji imaju pozitivan učinak na zdravlje domaćina. Zbog kiselosti meda, kvasci i bakterije mliječne kiseline su dominantni mikroorganizmi u medu, no prisutni su i *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* vrste koje su probiotici [115].

Prebiotici su tvari koje potiču brz razvoj i biološku aktivnost dobrih bakterija u GIT-u; hrana za probiotike. Najčešći prebiotici su oligosaharidi, kao što su fruktooligosaharidi (FOS), galaktooligosaharidi (GOS) i inulin. Med sadrži različite oligosaharide, ovisno o stupnju polimerizacije, te na taj način potiče rast i aktivnost bifidobakterija. Koristi se za poboljšanje GIT zdravlja tako što se pomiješa s fermentiranim mliječnim proizvodima s bifidobakteijama i laktobacilima [116].

Konzumiranjem relativno velike količine meda (70 do 95 g) može doći do laksativnog učinka s malapsorpcijom fruktoze. Općenito med djeluje laksativno.

4.2.8. Antivirusna aktivnost

Manuka med je učinkovit u sprječavanju daljnjeg širenja virusa. Pokazano je da *in vitro* inhibira *Rubella* i *Herpes* virus te ima anti-HIV-1 učinak zbog metilglioksala [117]. Koristi se topikalno za liječenje rekurentnih lezija uzrokovanih *Herpes simplex* virusom. Kod labijalnog i genitalnog herpesa smanjio je trajanje bolesti, bol i pojavu ljuskica, znatno bolje od aciklovira [118].

Med manuke pokazao je inhibitornu aktivnost na virus influence te primjenjivan skupa s zanamivirom ili oseltamivirom, u koncentraciji od 3,13 mg/mL, smanjio je njihov IC_{50} (polovična maksimalna inhibitorna koncentracija djelatne tvari) za tisućinu od lijekova primjenjivanih pojedinačno [119].

Unosom meda 50 g/dan smanjuje se trajanje prehlade za dva dana [120]. Uzimanjem meda tri puta na dan (ukupno 45g), tijekom studije koja je trajala 20 godina, nijedan sudionik nije obolio od neke virusne infekcije, dok je kontrolna grupa oboljela od prehlade ili grlobolje tri do četiri puta godišnje. Dugoročno uzimanje meda djeluje imunostimulacijski protiv infekcija [121].

U *in vitro* studiji med manuke je pokazao značajan učinak (EC_{50} = 4,5% w/v) na varicella-zoster virus (VZV) izolate. Može se primijeniti topikalno u liječenju osipa uzrokovanog ovim virusom [122].

4.2.9. Antifungalna aktivnost

Med djeluje antifungalno na dermetofite koji mogu uzrokovati mikoze (Tinea), *Epidermophyton*, *Microsporum* i *Thrichophyton*, uključujući i vrste rezistentne na flukonazol i mikonazol. Pokazao se djelotvornim i protiv *Candida albicans*, najčešćeg uzročnika infekcija genitalnog sustava. Njegov učinak je bio usporediv ili bolji od komercijalnih antimikotika (nistatin, klotrimazol ili mikonazol) [123].

4.2.10. Antiparazitska aktivnost

Uočeno je da med djeluje kao antihelmintik kod glista, trakavica i oblića. Na temelju svog kiselog pH, med prevenira rast mnogih parazita i stvara loše uvjete za njihov daljnji rast. Više koncentracije su brže ostvarile paralitički učinak na parazite [124].

4.2.11. Primjena u oftalmologiji

Primjena meda na donji dio kapka kod keratitisa (upala rožnice oka), konjuktivitisa (upala očne spojnice) i blefaritisa (upala očnih vjeđa), koji nisu reagirali na konvencionalne lijekove, pokazala je poboljšanje simptoma. Primjećen je osjećaj žarenja i crvenilo oka, ali ne dovoljno da bi se spriječilo liječenje medom [125]. Tretiranje kemijske inducirane katarakte (zamućenje očne leće; vodeći uzrok sljepoće) medom pokazalo je poboljšanja i usporenje progresije bolesti [126]. Med se u oftalmologiji obično upotrebljava u obliku masti.

4.2.12. Primjena kod kardiovaskularnih bolesti

Pokazano je da med smanjuje čimbenike rizika štetnih kardiovaskularnih (KV) događaja kod zdravih i ljudi s već postojećim čimbenicima rizika. Kod grupe pretilih ljudi koja je konzumirala 70 g meda dnevno tijekom mjesec dana smanjio se ukupni kolesterol, LDL kolesterol, trigliceridi, C-reaktivni protein, GUK natašte te se povećao HDL kolesterol, za

razliku od grupe koja je dobivala saharozu. Još bolji rezultati su bili kod ljudi s već povećanim rizikom od KV događaja te nije došlo do povećanja tjelesne težine [127].

Med sadrži dušikove okside koji mogu imati protektivnu ulogu na kardiovaskularni sustav koji kao vazodilatatori reguliraju arterijski tlak. Tamnije i svježije vrste meda sadrže više metabolita NO od svjetlijih i skladištenih, dok se zagrijavanjem gube NO metaboliti kod svih vrsta meda [5].

Istraživanja na štakorima su pokazala da se konzumacijom meda smanjuju simptomi bolesti srca, kao što su ekstrasistola, aritmija i tahikardija [128]. Postoje dokazi da med smanjuje agregaciju trombocita i koagulaciju krvi [129].

4.2.13. Primjena kod dijabetesa

Med je visokokalorična namirnica, bogata ugljikohidratima zbog čega se dugo nije preporučivao dijabetičarima. Međutim, u nekim istraživanjima je dokazano da su se konzumacijom meda kod dijabetes tipa II smanjile komplikacije bolesti kao što su povišen krvni tlak, angina, dislipidemija, i to usprkos trajno povišenoj GUK.

Glikemijski indeks (GI) je mjera koja označava brzinu i intenzitet povišenja razine glukoze u krvi nakon konzumiranja određene hrane. Hrana koja posjeduje nisku vrijednost glikemijskog indeksa uzrokuje mali porast glukoze u krvi i obrnuto. Glikemijski indeks meda manuke nalazi se na umjerenoj razini (srednja razina GI od 56 do 69) varirajući od 54 do 59 za razliku od ostalih vrsta meda čiji GI može iznositi i do 85 [130].

Američko dijabetološko društvo je 2002. godine istaknulo da je bitna ukupna količina ugljikohidrata u obrocima, a ne vrsta ugljikohidrata. U skladu s tim, med bi se mogao koristiti kod dijabetičara kao dio ukupnih ugljikohidrata u individualnoj dijabetičkoj dijeti. U obzir treba uzeti i sve druge pozitivne učinke meda koje dijabetičarima mogu pomoći u regulaciji poremećenog metabolizma i u usporavanju komplikacija dijabetesa (npr. dijabetičko stopalo, ulceracije) [4, 131].

4.2.14. Primjena kod neuroloških poremećaja

Kod miševa hranjenih medom uočeno je značajno smanjenje anksioznosti i bolji kapacitet pamćenja, kratkoročni i dugoročni te antidepresivni učinak sličan onom kod MAO inhibitora (inhibitori monoaminooksidaze tipa A i B) [132]. Med je smanjio i broj degeneriranih neurona u hipokampalnom CA1 području (dio osnovnog hipokampusnog kruga; Cornu Ammonis (CA) – Amonovi rogovi) koje je vrlo podložno oksidativnom inzultu. Nadalje, primjenom

meda različitih koncentracija, pokazao se ekscitacijski učinak meda na središnji živčani sustav, posebno pri najvišoj nesedirajućoj dozi (najviša doza koja ne uspavljuje). Osim toga, postoji mogućnost da su glija stanice osjetljive na med pošto se pokazao neuroprotektivni učinak u cerebro-fokalno induciranoj ishemiji (ishemija inducirana u mozgu) kod miševa [5].

4.2.15. Med kao antitusik

Male doze meda, 1-2 žlice (ovisno o dobi; 2-5 godina ½ žlice, 6-11 godina 1 žlica, 12-18 godina 2 žlice) učinkovite su kod kašlja i olakšavanja sna kod djece koja kašlju te je jednako učinkovit kao i sintetski sirupi protiv kašlja (dekstrometorfan) [133, 134].

4.2.16. Utjecaj meda na oralno zdravlje

Velike su polemike oko koristi i rizika primjene meda na zube. Dokazan je kariogeni učinak meda (pospješivanje nastanka karijesa), ali i manja kariogenost meda u odnosu na saharozu te čak i karioprotektivni učinak zbog antibakterijskog djelovanja meda.

Uočeno je da med za razliku od voćnih sokova (pH=3,5), ne izaziva eroziju zubne cakline, vjerojatno zbog sadržaja kalcija, fosfata i fluorida [135].

Oralne lezije, kao što su aftozni stomatitis, rekurentni herpes labialis, rekurentni intraoralni herpes, erozivni oralni lichen planus, oralna kandidijaza i oralna psorijaza mogu se uspješno liječiti medom [136]. Preporučuje se stavljanje meda direktno na leziju ili držanje i okretanje kroz usnu šupljinu tijekom nekog vremena te čišćenje zubiju nakon tretmana, iz sigurnosnih razloga. Med djeluje protuupalno, smanjuje bol te skraćuje vrijeme trajanja oralnih lezija.

Dokazano je da manuka med zbog jakog antibakterijskog učinka sprječava stvaranje zubnog plaka te nastanak gingivitisa (upala desni). Žvakanjem meda smanjio se nastanak plaka i broj bakterija, kao i kod inače primjenjivanih antibiotika. Primjenom meda, pH se nije smanjio ispod 5,5 (pH pri kojem dolazi do dekalcifikacije), za razliku od saharoze [137]. U drugoj studiji, ispiranjem usne šupljine manuka medom inhibiran je nastanak plaka jednako kao i s klorheksidinom [138]. Med manuke pokazao se djelotvornim i u liječenju halitioze (zadah iz usta).

4.2.17. Utjecaj meda na sportske rezultate

Konzumacijom tvari koje daju energiju prije, tijekom i nakon fizičke aktivnosti poboljšava se performans i obnova mišića. Žlica meda daje potrebnu energiju te je jeftina zamjena za komercijalne proizvode za poboljšanje sportskih rezultata [139].

Fiziološki učinci meda tijekom sporta su značajno povećanje frekvencije srca i konstantna razina glukoze u krvi, što ide u prilog medu kao boljoj zamjeni za glukozu.

Količina meda, u svrhu poboljšanja sportskih rezultata, trebala bi se odrediti prema tjelesnoj masi i vremenu konzumacije prije vježbanja. Četiri sata prije vježbanja treba uzeti 4 g/kg, jedan sat prije vježbanja 1 g/kg te 10 minuta prije vježbanja 0,5 g/kg tjelesne težine [124].

4.2.18. Primjena meda u dječjoj prehrani

Dojenčad koja su u svojoj prehrani imala med pokazala su povećanje koncentracije hemoglobina, ljepši ton kože, lakši i tanji feces, brže povećanje tjelesne težine, manju podložnost bolestima te su bila bez probavnih smetnji, naspram dojenčadi sa saharozom i bez meda u prehrani [140]. No u medu je prisutna *Clostridium botulinum* čije spore mogu preživjeti u želucu dojenčeta mlađeg od jedne godine i stvarati toksine (botulizam) stoga se ne bi smio primjenjivati do prve godine života .

Dokazano je da med u prehrani djece poboljšava pamćenje i rast, djeluje anksiolitički (ublažava psihičke poremećaje, neurozu, tjeskobu) i poboljšava djelovanje djeteta kasnije u životu [141].

4.2.19. Utjecaj meda na plodnost

U studiji na miševima s 5%-tnom otopinom meda u vodi, uočen je pozitivan učinak meda na plodnost. Modificirani folikulostimulirajući hormon (FSH), luteinizirajući hormon (LH) i testosteron su se kvalitativno poboljšali te je uočen pozitivni učinak na vitamin E. Suplementacija meda (nadopuna prehrani) od 1 g/kg pokazala je oporavljajući učinak na promijenjenu koncentraciju gonadotropina [142]. Primjena meda kod miševa tijekom gestacijskog razdoblja, pokazala je pozitivne učinke na razinu kortizola („hormon stresa“) i na ishod trudnoće [126]. Potrebna su daljnja istraživanja za donošenje ozbiljnih zaključaka u ovoj indikaciji.

4.2.20. Primjena meda u kozmetičke svrhe

Med se nalazi u mnogim kozmetičkim proizvodima. Čini hidrofilni dio emulzije koji služi kao ovlaživač kozmetičkog proizvoda i kože. Proizvodi s medom su prikladni za sve tipove kože, koju hidratizira, omekšava i zacjeljuje. Med je higroskopan, djeluje antibakterijski i antifungalno te njegovi sastojci hrane kožu, kao i kosu. Kiselost meda pridonosi jačanju gornjeg zaštitnog, kiselog sloja kože (pH kože je oko 5,5) [5, 124].

5. RASPRAVA

5.1. Zahtjevi kakvoće meda

Med podliježe određenim zahtjevima kakvoće. Postoje propisi za sadržaj šećera i vode, sadržaj tvari netopljivih u vodi i slobodnih kiselina te za električnu provodnost. Medu se nikakve dodatne tvari ne smiju dodati niti oduzeti. Prirodni oblik ove namirnice je bitan kriterij, što se očituje i u zabrani zagrijavanja ili neprikladnog skladištenja meda.

Kontrolni parametar je sadržaj HMF-a u medu i njegova enzimska aktivnost, koji su zakonski određeni. Med koji sadrži HMF viši od 40 mg/kg, odnosno 80 mg/kg za tropske vrste meda, smatra se proizvodom manjkave kvalitete.

Aktivost enzima dijastaze je drugi čimbenik, pritom je dijastazni broj mjera za aktivnost ovog enzima, koji govori koliko se škroba razgradi u 100 g meda unutar jednog sata u eksperimentalnim uvjetima [143]. Dijastazni broj kod meda mora iznositi minimalo 8 odnosno kod enzimski slabijih vrsta meda 3. Invertaza je također čimbenik koji može ukazati na termičko oštećenje meda. Osjetljivija je od dijastaze na skladištenje i toplinu, stoga se eventualna oštećenja meda mogu uočiti već nakon kraćeg djelovanja više temperature. Ne postoje zakonske norme za aktivnost invertaze.

Bitna je i analiza botaničkog podrijetla meda melisopalinologijom te biljnim markerima (polifenoli, hlapljivi spojevi). Sukladno tomu potrebno je otkriti patvoreni med npr. u obliku proizvoda nastalih od pčela hranjenih saharozom ili miješanih s drugim vrstama meda. Problematična je i u međuvremenu dopuštena filtracija meda, kojom se i polen odstranjuje. Nije dopušteno dodavanje filtriranog u nefiltrirani med [144].

5.2. KEMIJSKI SASTAV

5.2.1. Antioksidansi

Razlike u antioksidacijskoj aktivnosti između različitih vrsta meda postoje zbog prirodnih varijacija u sastavu (šećeri, minerali i sadržaj vode), lokaciji i cvjetnom izvoru nektara.

Antioksidansi mogu biti endogeni i egzogeni. Endogeni mogu biti enzimski (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza i transferaza, citokrom c) i neenzimski antioksidansi (karotenoidi, askorbinska kiselina, α-tokoferol, glutation, koenzim Q10). Egzogenim antioksidansima pripadaju hvatači slobodnih radikala („scavengers“) i prijelazni elementi (Se, Zn) [145].

Enzimski antioksidansi su prvi obrambeni mehanizam protiv slobodnih radikala u organizmu čovjeka, neutraliziraju ih već pri njihovom nastanku. No starenjem se stvaranje tih enzima smanjuje te postaje sve važnija konzumacija hrane bogate antioksidansima, u koju spada i med. Antioksidansi prisutni u prirodnim prehrambenim proizvodima pokazuju značajan antioksidacijski kapacitet. Osim toga sprječavaju kvarenje uzrokovano oksidacijskim promjenama uslijed djelovanja svjetlosti, topline i nekih metala [108].

Reaktivni oblici kisika ili ROS (eng. reactive oxygen species) nastaju iz molekularnog kisika normalnim staničnim metabolizmom. U niskoj do umjerenoj koncentraciji su sastavni dio fizioloških staničnih procesa (pomažu u metabolizmu oksidirajući ugljikohidrate, masti i bjelančevine stvarajući toplinu i energiju), no u visokoj koncentraciji uzrokuju štetne modifikacije staničnih dijelova (lipidi, proteini, DNA).

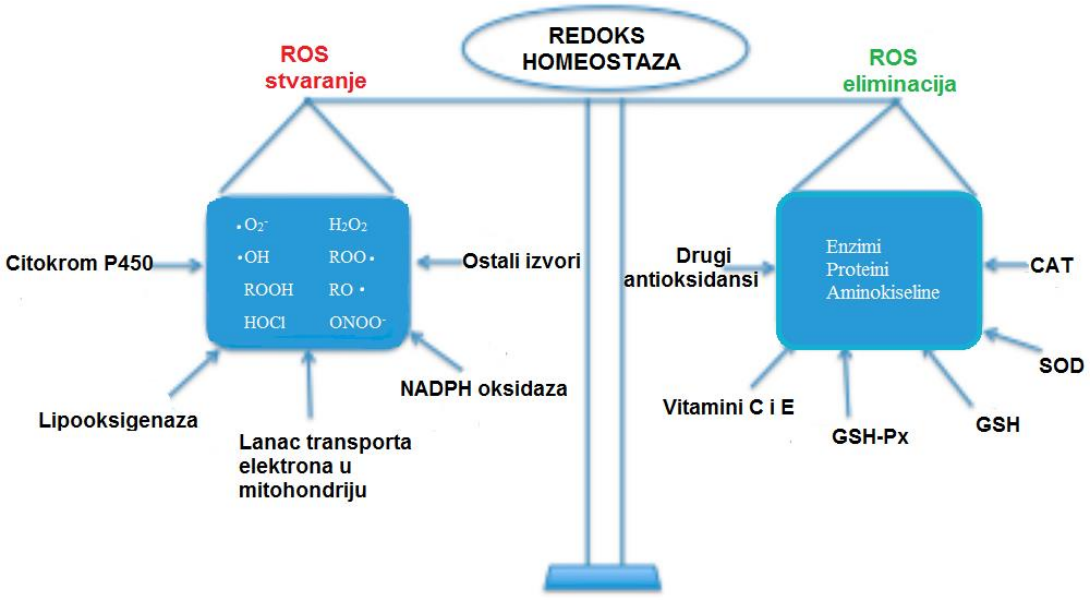
Mogu se podijeliti na slobodne radikale i neradikale. Slobodni radikali su molekule koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona te stoga molekula postaje reaktivna. Neradikalni oblici nastaju kada dva slobodna radikala dijele svoje nesparene elektrone.

Fiziološki značajni ROS-ovi su superoksid anion (O^{2-}), hidroksilni radikal (•OH) i vodikov peroksid (H_2O_2). Hidroksilni radikal je najreaktivniji ROS, a može oštetiti proteine, lipide, ugljikohidrate i DNA. Ukoliko ROS potakne peroksidaciju lipida oduzimanjem elektrona višestruko nezasićenim masnim kiselinama, dolazi do narušenja integriteta stanične membrane i promjene stanične strukture. Vodikov peroksid, superoksidni radikali, oksidirani glutation (GSSG), izoprostani, karbonili i nitrotirozin mogu se mjeriti kao biomarkeri oksidacije u plazmi i krvi [145].

Egzogeni izvori oksidanasa su cigaretni dim, izlaganje ozonu, hiperoksija, ionizirana radijacija, UV zračenje, lijekovi, prehrana, pesticidi i teški metali (Fe, Cu, Cd, Hg, Ni, Pb, Ar) [146].

Oksidacijski stres nastaje disbalansom antioksidansa i ROS-a zbog manjka antioksidansa, nedostatka esencijalnih djetetskih tvari (Cu, Fe, Zn, Mg) ili akumulacije ROS-a (Slika 20.). Tada stanice pokušavaju poništiti oksidacijski učinak i vratiti redoks ravnotežu aktivacijom ili utišavanjem gena koji kodiraju obrambene enzime, transkripcijske faktore i strukturne proteine. Omjer oksidiranog i reduciranog glutationa (2GSH/GSSG) je bitan pokazatelj oksidacijskog stresa u tijelu.

Povišeno stvaranje ROS-a u tijelu može promijeniti DNA strukturu, modificirati proteine i lipide, aktivirati stresom inducirane transkripcijske faktore i stvaranje proinflamatornih i antiinflamatornih citokina. Ljudski organizam ima ugrađeni antioksidacijski sustav, no u patološkim stanjima taj sustav može biti prezasićen. To pridonosi razvoju bolesti uključujući tumore, neurološke bolesti, aterosklerozu, hipertenziju, ishemiju, dijabetes, astmu i mnoge druge. Kod procesa upale leukociti stvaraju slobodne radikale u inficiranim ili oštećenim tkivima. Protuupalno djelovanje meda zasniva se upravo na sprječavanju nastanka slobodnih radikala tj. antioksidacijskom djelovanju [145].



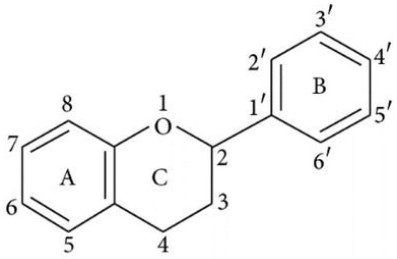
*radikali: $O_2^{\cdot}$- superoksidni anion, $^{\cdot}OH$ – hidroksil, HOCl – hipokloritna kiselina, H_2O_2 – vodikov peroksid, $ROO^{\cdot}$- peroksil, $RO^{\cdot}$- alkoksil, $ONOO^-$ - peroksinitrit anion

CAT – katalaza, SOD – superoksid dismutaza, GSH – glutation, GSH-Px – glutation peroksidaza

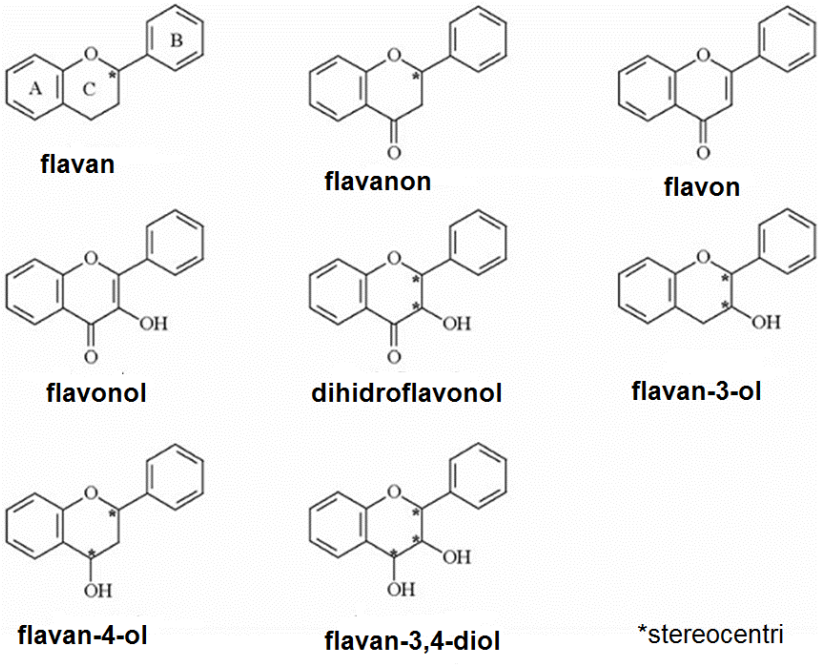
Slika 20. Redoks homeostaza – stvaranje i eliminacija ROS-a.

5.2.2. Flavonoidi

Općenito pojam „flavonoid“ (lat. flavus = žut) stoji za grupu prirodnih spojeva, čija je osnovna kemijska struktura 15 ugljikovih atoma (fenilbenzopiran) povezanih u jezgru od dva aromatska prstena A i B, povezana heterocikličkim piranskim prstenom C (Slika 21.). Dijele se u tri skupine: flavonoidi (2-benzopirani), izoflavonoidi (3-benzopirani) i neoflavonoidi (4-benzopirani). Dijele se i prema stupnju oksidacije i saturacije heterocikličkog C prstena (Slika 22.) [147].



Slika 21. Osnovna struktura flavonoida.



Slika 22. Podjela flavonoida prema stupnju oksidacije i saturacije prstena C [147].

Raznovrsnost flavonoida kontroliraju geni biljke, ali i zrelost biljke, klima i način uzgoja. U prirodi se flavonoidi nalaze uglavnom u obliku glikozida. Osim šećera, supstitucijske grupe koje se nalaze na osnovnoj jezgri su hidroksilna i metoksi grupa što pridonosi velikoj raznolikosti tih spojeva [93]. Postoji i velika sklonost umrežavanju i polimerizaciji (npr. tanini).

Raspored supstituenata, a najviše raspored i ukupni broj hidroksilnih grupa određuju antiksidacijsku aktivnost polifenola.

Flavonoidi mogu djelovati kao antioksidansi na više mogućih načina. Prekidaju lančanu reakciju slobodnog radikala djelujući kao hvatači slobodnih radikala. Moguće da stupaju u interakcije s drugim fiziološkim antioksidansima, npr. s vitaminom C i E, djelujući sinergistički. Aktiviraju antioksidacijske enzime te inhibiraju oksidazu. Stvaraju i kelatne komplekse s ionima prijelaznih metala ($Fe^{2+,}$ $Cu^{2+,}$ Zn^{2+} i Mg^{2+}). Međutim u prisustvu $Cu^{2+,}$ flavonoidi pokazuju i negativnu prooksidacijsku aktivnost te se to svojstvo ne smije zanemariti ukoliko dođe do ozljede ili aterosklerotskih lezija [76].

Bogati izvori flavonoida su: svježe voće i povrće, zeleni i crni čaj, kakaovac, med i propolis. Sastavni su dio i ljudske i životinjske prehrane, ali se ne mogu sintetizirati u ljudima niti u životinjama.

Imaju zaštitno djelovanje kod sisavaca djelujuću antibakterijski, antifungalno, antivirusno, antikancerogeno, antiteratogeno, zaštita DNA, lipoproteina niske gustoće (LDL), ihibicija nastajanja upala, trombocita, estrogeni efekt i očuvanje receptora, a utječu i na boju i okus hrane. Neki flavonoidi su označeni kao biomarkeri određenih vrsta meda.

Ispitivanja sadržaja fenolnih spojeva i flavonoida u medu pokazala su da postoji korelacija s cvjetnim i geografskim porijeklom s jedne strane i antimikrobnim djelovanjem s druge strane. Uspoređujući s drugim vrstama meda, manuka med pokazuje najveći sadržaj flavonoida i fenolnih kiselina koji su odgovorni za njegov snažni antimikrobni učinak zajedno s visokim sadržajem metilglioksala.

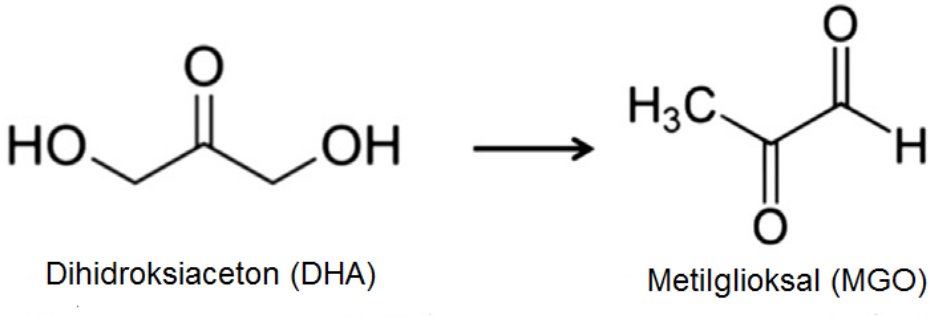
5.2.3. 1,2-Dikarbonilni spojevi

Glioksal (GO), 3-deoksiglukozon (3-DG) i metilglioksal (MGO) su produkti Maillardove reakcije. Doprinose neperoksidnoj antibakterijskoj aktivnosti. Snažna antibakterijska aktivnost meda manuke pripisuje se uglavnom značajnom sadržaju MGO-a.

MGO je α-oksoaldehid koji nastaje glikolizom i fosforilacijom iz trioza-fosfat intermedijera te iz aminokiselina i acetona. U hrani može nastati iz šećera koji se termički obrađuju ili dužim skladištenjem hrane i pića koji sadrže ugljikohidrate (razgradnjom ugljikohidrata, lipida ili pretvorbom mikroorganizmima) [98]. U medu MGO može nastati enzimski i neenzimski, ovisno o tvarima prisutnima u medu i o okolišnim čimbenicima. Primarno nastaje konverzijom dihidroksiacetona (DHA) Maillard-ovom reakcijom (Slika 23.). Manuka med

skupljen iz saća, obično sadrži nisku koncentraciju MGO, a visoku DHA. Taj odnos se mijenja tijekom skladištenja meda kada MGO sadržaj raste, a DHA smanjuje zbog konverzije [148].

Stvaranje DHA u nektaru i razlog zašto se nalazi u tako visokoj koncentraciji u manuka biljkama je još uvijek nepoznat. Sadržaj MGO u fermentiranim mliječnim proizvodima, vinu, pivu i mljevenoj kavi je od 3 do 47 mg/kg, dok je u manuka medu i do 828 mg/kg [67, 82]. MGO je i reaktivni metabolit koji može djelovati toksično [149]. Unatoč tome već duži period se sigurno primjenjuje te se serije manuka meda s maksimalnim sadržajem MGO koriste u medicinske i nutritivne svrhe [60].



Slika 23. Konverzija dihidroksiacetona u metilglioksal.

Sadržaj DHA u medu manuke varira pošto konc. DHA u skupljenom nektaru *L. scoparium* vrsta značajno varira te jer DHA podliježe kemijskim reakcijama u otopini meda tijekom zrenja.

MGO nije prisutan u nektaru, nego njegova konc. brzo raste tijekom skladištenja meda manuke jer se odvija konverzija DHA u MGO. Nakon petogodišnjeg roka trajanja meda manuke, sadržaj MGO se počinje smanjivati zbog manjka DHA potrebnog za održavanje stalne konc. MGO [88].

U eksperimentima s povišenom temperaturom tijekom skladištenja, 37ºC tijekom tri mjeseca, DHA se smanjio za 18%, a MGO za 46% te se konc. dalje mijenjaju zrenjem. Obrnuto, snižena temperatura skladištenja će rezultirati značajnim smanjenjem kemijskih reakcija u medu [150]. Može se zaključiti da se na konc. DHA i MGO može znatno utjecati obradom i uvjetima skladištenja. Osim toga, leptosperin i lepteridin ne koreliraju sa sadržajem DHA i MGO. Iz navedenih razloga DHA i MGO nisu pouzdani markeri meda manuke.

5.3. Botaničko i zemljopisno podrijetlo meda manuke

5.3.1. Melisopalinologija

Melisopalinologija je tradicionalna kvantitativna i kvalitativna tehnika određivanja kvalitete pčelinjih proizvoda analizom peludnih zrnaca. Kvalitativnom analizom (%) se identificiraju peludna zrnca i elementi medljike, a temelji se na morfološkoj razlici između peludnih zrnaca. Mikroskopskim pregledom se mogu razvrstati do vrste, roda i porodice. Kvantitativnom analizom se procjenjuje ukupni volumen taloga i apsolutne količine elemenata po jedinici mase, što omogućava utvrđivanje načina dobivanja meda (vrcanje, cijeđenje) [31].

Međutim melisopalinologija nije primjenjiva kod karakterizacije meda manuke. Problem predstavlja uglavnom kanuka med (*Kunzea ericoides*) koji cvjeta na Novom Zelandu u isto vrijeme kad i med manuke, a njihova peludna zrnca se ne mogu razlikovati u medu [151]. Donedavno se smatralo da su srodne vrste. Manuka med ima jedinstvene medicinske kvalitete te sukladno tome je skuplji, dok je kanuka slatki kulinarski med. Pošto analitičari polena ne mogu razlikovati polen tih dvaju medova, udio 70% polena koja se pripisuje jednoj od vrsta se ne može točno odrediti. Peludna zrnca „jellybush“ (*Leptospermum polygalifolium*) iz Australije također se teško razlikuju od manuka zrnaca, ali ipak iskusni analitičari peludi mogu razlikovati pelud koja je nativna u Australiji, a ne na Novom Zelandu. „Jellybush“ med pokazuje neperoksidnu aktivnost i ima značajnu količinu metilglioksala, slično kao i manuka med [152].

5.3.2. Reologija

Reološkim ispitivanjem (proučavanjem deformacije i tečenja tvari pod utjecajem smičnog naprezanja) može se zaključiti da je uzorak pretežno manuka, kanuka ili mješavina tih dvaju vrsta meda. Mjeri se ukupna viskoznost koja ovisi o sastavu meda (sadržaj šećera, vode) i temperaturi. Većina vrsta meda (npr. kanuka med) su newtonski fluidi tj. unatoč povećanju smičnog naprezanja (sila po jedinici površine na plohu u smjeru plohe), viskoznost ostaje konstantna.

Međutim *Leptospermum* spp. (uključujući manuku) te med vrijeska pokazuju nenewtonske karakteristike tj. tiksotropnost ili pseudoplastičnost (*eng.* „shear-thinning“). Kod njih se prividna viskoznost pri konstantnoj smičnoj brzini ili pri konstantnom smičnom naprezanju snižava u vremenu. Kada se sustav vraća u stanje mirovanja, ponovno se stvara gel struktura, kao na početku. Ove vrste meda sadrže značajan udio proteina.

Fenomen tiksotropnosti se može uočiti miješanjem meda žlicom. Manuka med dobre kvalitete s udjelom vode 17-18% će biti želatinozan, vrlo malo mobilan. Ako se miješa snaž-

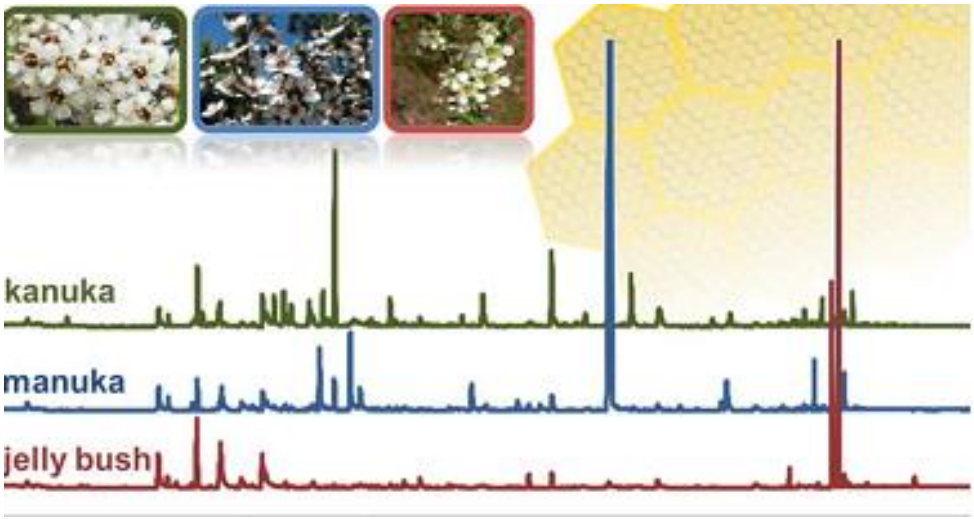
no par minuta, postat će tekući, lako se može izliti u drugu posudu. Ukoliko uzorak miruje tijekom nekog vremena, vratit će se u prvobitno stanje. No ako je sadržaj vode iznad 21% ili ako je tiksotropni med pomiješan s malo newtonskim tipom meda, manualno vizualno određivanje postaje teško ili nemoguće.

Manuka med ima indeks viskoznosti – 0,500, a kanuka med blizu nuli. „Jellybush" med (također *Leptospermum* spp.) ima slična reološka svojstva kao i manuka te ovim ispitivanjem ih je teško razlikovati [152].

5.3.3. Cvjetni markeri meda manuke

Različite analitičke metode se koriste za određivanje botaničkog podrijetla monoflornog meda, kao što su analiza polena (melisopalinologija; tradicionalna metoda) ili mjerenje nekoliko analitičkih parametara: sadržaj šećera, profil fenolnih spojeva i flavonoida, provodljivost, sadržaj minerala, pH, boja, stabilni izotopi. Bitne su i hlapljive organske tvari, čija frakcija u medu sadrži više od 150 organskih spojeva [153].

Prevelika ili premala zastupljenost polena ili slične granule polena, kao što je polen iz iste porodice manuka i kanuka, kompliciraju mikroskopsku analizu. Iz tog razloga se danas pribjegava objektivnom kemijskom pristupu karakterizacije botaničkog podrijetla.



Slika 24. Razlikovanje kanuka, manuka i „jellybush" vrsta meda po sadržaju fitokemikalija [84].

5.3.3.1. Hlapljivi spojevi

Hlapljive tvari meda mogu se svrstati u 7 glavnih grupa: aldehidi, ketoni, kiseline, alkoholi, esteri, ugljikovodici i ciklički spojevi. Daju specifičnu aromu medu; uniflorni med posjeduje visokospecifičan aromatični profil naspram poliflornog meda. Te specifične hlaplji-

ve tvari karakteristične za određene biljne vrste se koriste kao markeri u identifikaciji meda. Potječu od nektara ili medljike te medonosnih pčela, mogu nastati tijekom termičke obrade i skladištenja meda, a ovise o biljnoj vrsti i stupnju zrelosti meda.

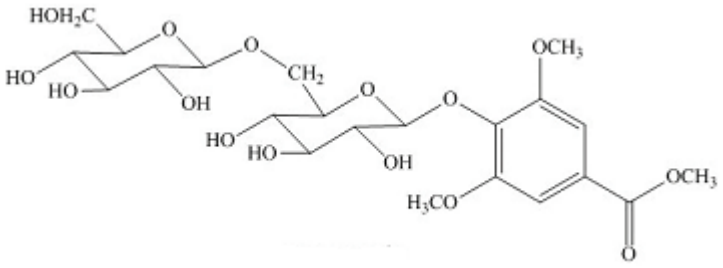
Utjecaj određenog spoja na aromu ovisi o koncentraciji pri kojoj premašuje mirisni prag. Treba uzeti u obzir i moguće sinergističke i antagonističke reakcije između komponenti. Stoga spojevi prisutni i u niskim koncentracijama mogu utjecati na aromu meda [32].

5.3.3.2. Fluorescencijski markeri

Poznati su jedinstveni fluorescencijski profili meda manuke i kanuke, čime se razlikuju od ostalih vrsta meda Novog Zelanda koji ne fluoresciraju. Kod meda manuke su MM1 i MM2, a kod meda kanuke KM1 i KM2 valne duljine ekscitacijsko-emisijskih markera.

Fluorescencijskom spektrometrijom su utvrđena dva fluorescencijska signala jedinstvena medu manuki. MM1 fluorescencijski signal ($_{ex}$270-$_{em}$365 nm) s kojim se povezuje spoj leptosperin te MM2 ($_{ex}$330-$_{em}$470 nm) karakterističan za lepteridin [89, 90]. Razrjeđenjem meda manuke s drugim medovima Novog Zelanda, koji nisu fluorescirali na navedenim valnim duljinama, rezultiralo je smanjenjem fluorescencijskog signala proporcionalno razrjeđenju [154].

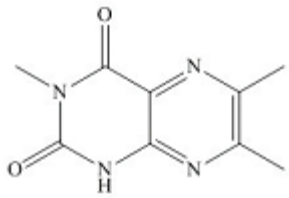
Leptosperin (metil-siringat-4-*O*-ß-D-gentibioza) je za razliku od metil-siringata, čiji je glikozid, prisutan samo u *L. scoparium* na Novom Zelandu, u nektaru i medu manuke. Kvantificiran je primjenom LC i MS, a odnedavno i fluorescencijskom spektrometrijom na MM1 valnoj duljini. Minimum leptosperina u medu manuke bi trebao biti 100 mg/kg [150]. Pokazao se stabilnim dužim skladištenjem, stoga je idealan kemijski i fluorescencijski marker meda manuke.



Slika 25. Kemijska struktura leptosperina.

Lepteridin (derivat pteridin-3,6,7-trimetillumazina) je također prisutan u *Leptospermum* spp. nektaru na Novom Zelandu, uključujući i manuka med. Kvantificiran je LC metodom, a fluorescencijskom spektrometrijom fluorescira na MM2 valnoj duljini. Njegova kon-

centracija u medu manuke varira od 5 do 50 mg/kg [89]. Kao i leptosperin, stabilan je na višim temperaturama skladištenja, stoga je relevantan kemijski i fluorescencijski marker meda manuke.



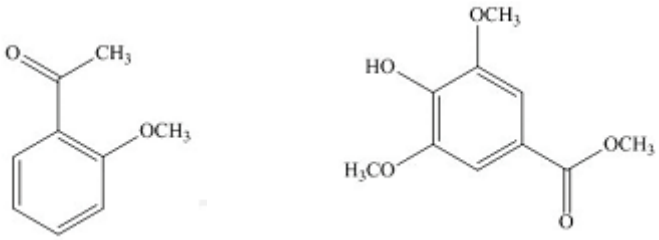
Slika 26. Kemijska struktura lepteridina.

Fluorescencija leptosperina i lepteridina utvrđena na MM1 i MM2 pokazuje veliku linearnu korelaciju u medu manuke [150].

5.3.3.3. Drugi nefluorescencijski markeri (nehlapljivi spojevi)

2-metoksiacetofenon (2-MAP) je ranije predložen kao marker meda manuke koristeći metode HS-SPME-GC/MS [84]. Koristeći metodu HPLC-DAD [150], konc. 2-MAP snažno je korelirala s konc. leptosperina te je stoga navedeni spoj potencijalni marker meda manuke.

Konc. **metil-siringata (MSYR)** je povišena u medu manuke i kanuke na Novom Zelandu [79]. Linearna korelacija između MSYR i leptosperina je slaba, što je moguća refleksija sadržaja meda kanuke u medu manuke. Med kanuke dodatno pridonosi povišenju MSYR. Stoga navedeni spoj nije pouzdani kemijski marker meda manuke.



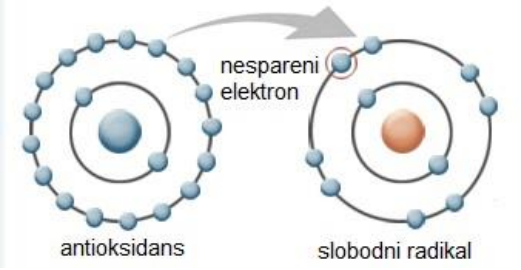
Slika 27. Kemijske strukture 2-metoksiacetofenona i metil-siringata.

5.4. BIOLOŠKA AKTIVNOST

5.4.1. Mehanizam antioksidacijske aktivnosti

Postoji par mehanizama antioksidacijskog učinka:

1. **Hvatanje slobodnih radikala** te doniranje vodikovog iona, pri čemu nastaju relativno stabilni antioksidacijski radikali s niskim redukcijskim potencijalom (Slika 28.). Antioksidacijski radikal ima veću stabilnost zbog rezonancijske delokalizacije elektrona u fenolnom prstenu. Efikasnost antioksidansa ovisi o energiji disocijacije veze između kisika i fenolnog vodika, pH koji se odnosi na konstantu disocijacije kiseline, redukcijskom potencijalu i delokalizaciji antioksidacijskog radikala.
2. **Keliranjem metala** smanjuje se oksidacija pošto se prevenira redukcijski ciklus metala stvaranjem netopljivih metalnih kompleksa ili steričkim smetnjama između metala i radikala ili oksidacijskog intermedijera.
3. **Gašenjem kisikovog singleta**, fizikalno i kemijski. Fizikalnim gašenjem, prijenosom energije ili napona, deaktivira se kisikov singlet na osnovno triplet stanje kisika. To se događa kada spoj koji gasi ima skoro pa jednak nivo energije kao i kisikov singlet. Reakcija oksidacije spoja koji gasi te nastanak raspadnutog ili oksidiranog produkta spoja gasitelja je kemijsko gašenje.
4. **Inhibicijom kemiluminiscencije u ksantin-ksantin oksidaza-luminol sustavu** te na taj način med djeluje protuupalno pošto su slobodni radikali uključeni u upalni odgovor kao što je regrutacija leukocita koja inicira daljnju upalu.
5. **Sinergizmom** dvaju ili više antioksidanasa tako što se jedan antioksidans (koantioksidans, sinergist) žrtvuje, sam se oksidira, kako bi zaštitio drugog učinkovitijeg antioksidansa (primarni) ili kombinacija dvaju i više antioksidanasa s različitim antioksidacijskim mehanizmima.



Slika 28. Stabilizacija slobodnog radikala.

Za određivanje antioksidacijskih svojstava meda najčešće se koristi DPPH test. Ispitivanje sposobnosti hvatanja DPPH• radikala preporučeno je raditi s koncentracijom DPPH• od 50 μM jer previše radikala uzrokuje pogreške u spektrofotometrijskom mjerenju. Otopina se može raditi s metanolom ili puferiranim metanolom, ovisno o topljivosti ispitivane tvari i os-

jetljivosti apsorbancije DPPH• na pH. Test bi se trebao odvijati u tamnoj ili slabije osvijetljenoj prostoriji jer apsorpcija ovisi i o količini svjetlosti [155].

Manuka med sadrži veliki antioksidacijski kapacitet koji je usporediv s australskim „jellybush“ i brazilskim eukaliptusovim medom. Pripisuje mu se i svojstvo hvatanja radikala u razini heljdinog meda te znatno snažnije od bagremovog meda, pritom manuka med ima specifično svojstvo hvatanja superoksid radikala.

Uspoređujući antioksidacijski kapacitet manuka meda s ostalim pčelinjim proizvodima, propolis i polen su imali snažniji antioksidacijski učinak od manuka meda, a medljikovac, matična mliječ i nektarni med slabiji. Flavonoidi i fenolne kiseline tj. ukupni udio polifenola u manuka medu odgovorni su za njegov antioksidacijski učinak te se pretpostavlja doprinos metil-siringata i drugih produkata Maillard-ove reakcije, ali potrebna su daljnja istraživanja [63].

5.4.2. Mehanizam antimikrobne aktivnosti

Rastuća rezistencija bakterija na antibiotike predstavlja veliki javnozdravstveni problem, a mali broj novih antibiotika se razvija. Stoga je neophodan komplementarni antimikrobni pristup. Već od davnina se med koristio u tretiranju rana i kao gastrointestinalni lijek. Djeluje na široki spektar patogena te na bakterije koje sudjeluju u kvarenju hrane, potentan je *in vitro* protiv bakterija rezistentnih na antibiotike, uspješno se aplicira u tretiranju kroničnih infekcija rana kod kojih antibiotska terapija ne ostvaruje učinak. Iz navedenih razloga sve je veći interes moderne medicine za medom manuke kao antimikrobnom tvari.

Neke vrste meda imaju jednak antibakterijski učinak kao i šećeri, dok se drugi mogu i stostruko razrijediti i još uvijek inhibirati rast bakterija. Razlika u antimikrobnoj potentnosti može biti i stostruka. Mehanizam antimikrobne aktivnosti meda manuke je kompleksan i nije do kraja razjašnjen. Može se podijeliti u dvije grupe mehanizama kojima ostvaruje antibakterijski učinak.

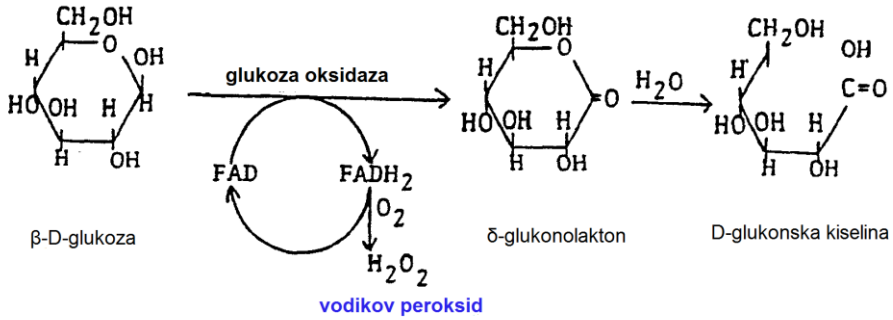
Mehanizam antimikrobne aktivnosti koji se temelji na fizikalno-kemijskim osobinama meda manuke uključuje:

- **Osmolarnost** - visoka koncentracija ugljikohidrata eliminira mikroorganizme, uglavnom bakterije koje su osjetljive na visoki osmotski tlak te inhibiraju razvoj osmotolerantnijih mikroorganizama
- **pH vrijednost** – niska, zbog visoke koncentracije organskih kiselina (npr. glukonska kiselina). pH iznosi od 3,57 do 4,21 [63], što je u skladu i s drugim vrsta-

ma meda te je dovoljno niska za inhibicijski učinak na veliki broj mikroorganizama [156].

Mehanizam antimikrobne aktivnosti koji se temelji na kemijskom sastavu meda manuke uključuje:

- **Defenzin-1** - peptid kojeg izlučuju medonosne pčele hipofaringealnim žlijezdama. Nalazi se i u matičnoj mliječi te vjerojatno igra ključnu ulogu u zdravlju larve. Pokazuje aktivnost protiv Gram-pozitivnih bakterija, uključujući *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* i *Paenibacillus larvae* (etiološki agens važan kod bolesti larve). Dok su visoki udio ugljikohidrata i nizak pH univerzalni antibakterijski čimbenik meda, uočene su velike razlike u količini ovog peptida u različitim vrstama meda.
- **Vodikov peroksid (peroksidna aktivnost)** – nastaje u medu kao nusprodukt pomoću pčelinjeg enzima glukoza oksidaze; oksidoreduktaza koja katalizira oksidaciju glukoze u glukonsku kiselinu (Slika 29.). Glukoza oksidaza nastaje u žlijezdi slinovnici pčele te izlučuje enzim u skupljeni nektar. Štiti med tijekom zrenja od patogenih mikroorganizama, no u zrelom medu je prisutan, ali neaktivan. Med je dovoljno zaštićen visokim osmotskim tlakom i niskim pH. Ponovno se aktivira razrjeđenjem meda, što je posebno bitno za zdravlje pčela i larvi, koje se primarno hrane medom [156]. Nastali H_2O_2 ima značajnu antimikrobnu aktivnost, no enzim katalaza, prisutan u tjelesnim tekućinama, ga razgrađuje te inaktivira, a glukoza oksidaza se brzo razgrađuje pod utjecajem topline i svjetlosti .



Slika 29. Reakcija katalizirana glukoza oksidazom – nastanak vodikovog peroksida.

- **Metilglioksal, MGO (neperoksidna aktivnost – NPA)** – 1,2-dikarbonilni spoj prisutan u visokoj koncentraciji je ključan antimikrobni čimbenik meda manuke kojeg ne razgrađuje katalaza iz tjelesnih tekućina i seruma. Razlike između glukoza oksidaze odgovorne za peroksidnu aktivnost i neperoksidne aktivnosti prikazane su u Tablici 7. Neperoksidna aktivnost ovisi i o vrsti manuke biljke iz koje je med nastao te o proporciji manuka nektara u medu.
- **Druge fitokemikalije**, posebno **fenoli** su bitni za antimikrobno djelovanje. Potrebna su dodatna istraživanja o sinergističkom učinku s MGO. Prema dosadašnjim saznanjima bitno podržavaju primarne antimikrobne čimbenike (visoka osmolarnost, nizak pH, defenzin-1, H_2O_2) [156].

Tablica 7. Značajke glukoza oksidaze (peroksidna aktivnost) i neperoksidne aktivnosti [157].

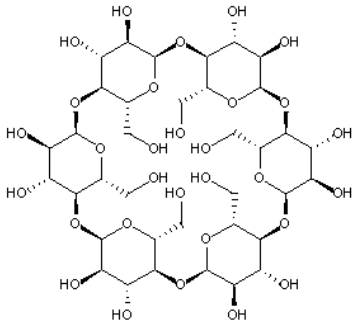
Glukoza oksidaza (stvara H_2O_2)	**Neperoksidna aktivnost (NPA)**
Osjetljiva na toplinu i svjetlost	Stabilna – ne gubi se tijekom skladištenja
Aktivna jedino pri razrjeđenju meda	Snažno djeluje u nerazrjeđenom medu – veća potentnost antibakterijskog učinka prodirući dublje u inficirano tkivo
Potreban kisik za reaktivaciju – možda neće djelovati ispod zavoja, dubljim ranama ili u crijevu	Uvijek aktivna
Postaje aktivna jedino kad je kiselost meda neutralizirana tjelesnom tekućinom, ali tada je med razrijeđen	Difundira dublje u tkiva
	Snažnije djeluje na neke patogene (*E. coli*, *Enterococci*, *H. pylori*)
Inaktivna u želudcu (nizak pH)	
Razgrađuju je proteinski probavni enzimi koji su u tekućini rane	

Previsoka koncentracija vodikovog peroksida oštećuje tkiva, uzrokuje oštećenje stanica i proteina u tkivu, što potiče stvaranje slobodnih radikala [158]. H_2O_2 nastao u medu aktivira se razrjeđenjem oko 1 mmol/L što je oko 1000 puta manje nego u konvencionalnim, obično 3%-tnim otopinama H_2O_2. Osim toga med ima sposobnost keliranja metalnih iona koji kataliziraju stvaranje kisikovih radikala iz H_2O_2 te med sadrži antioksidanse koji hvataju nastale slobodne radikale.

Ciklodekstrin je primarno ekscipijens (pomoćna tvar koja se dodaje djelatnoj tvari kako bi se dobila određena formulacija lijeka) hidrofobnih lijekova, koji povećava njihovu topljivost u vodi i stabilnost. Siguran je i koristi se u proizvodnji lijekova za oralnu, rektalnu, topikalnu i parenteralnu primjenu. Njegove bioaktivne prednosti predstavljaju potencijal naročito u GIT području te veću prikladnost za dijabetičare, a to su:

- topljivo je vlakno koje se ne hidrolizira amilazama sline ili pankreasa
- pridonosi stvaranju slobodnih masnih kiselina jer se ciklodekstrin fermentira intestinalnim mikroorganizmima
- reducira glikemijski indeks hrane u kojoj se nalazi

U kompleksu s manuka medom moguće je da održava antibakterijsku aktivnost kroz duži vremenski period što omogućuje veći učinak na infekcije. Kompleks je u obliku praška stoga je primjena jednostavnija, veća dostupnost djelatnih tvari na mjestu djelovanja i produženo oslobađanje djelatnih tvari u GIT-u [97].



Slika 30. Kemijska struktura α-ciklodekstrina.

Ukupna aktivnost (peroksidna i neperoksidna) određuje se razrjeđenjem meda u vodi. Potentnost neperoksidne aktivnosti mjeri se određivanjem baktericidnog djelovanja uzoraka meda na *Staphylococcus aureus* (najčešći uzročnik infekcija rana). Uspoređuje se s otopinom standardnog antiseptika; fenol u različitim koncentracijama. Uzorku se dodaje enzim katalaza (isključenje vodikovog peroksida) za detekciju isključivo neperoksidne aktivnosti meda. Neperoksidna aktivnost se determinira kao ekvivalentna koncentraciji fenola s jednakom antibakterijskom aktivnošću.

Za procjenu antibakterijske aktivnosti meda najčešće se koristi disk-difuzijska metoda. Ograničavajući čimbenik je što su različite vrste bakterija različito osjetljive na različite vrste meda. Osim toga, agar-difuzijskom metodom procjenjuje se aktivnost meda prema veličini zone inhibicije rasta koja ovisi o antimikrobnoj aktivnosti, ali i o brzini difuzije antibakterijskih komponenti kroz agar. Zbog spojeva relativno visoke molekulske mase koji su ograničeni u migraciji kroz agar, antibakterijska aktivnost meda može biti pogrešno određena kao niska. Također nije moguće odrediti kinetiku baktericidnog djelovanja meda [60].

Navedena ograničenja nastoje se prevladati kvantitativnom dilucijskom metodom određivanjem minimalne inhibicijske koncentracije (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK) meda. Dilucijska metoda se koristi i za karakterizaciju pojedinačnih komponenti meda s antibakterijskim učinkom.

5.4.3. Mehanizam djelovanja u zacjeljivanju rana

Trenutno primjenjivani proizvodi u tretmanu rana (zavoji sa srebrovim sulfadiazinom, hidrogelom, hidrokoloidom i alginatom) korisni su u limitiranju bakterijskih infekcija, no bakterijska rezistencija raste. Zbog odsutnosti bakterijske rezistencije kod meda te nižih troškova, raste interes za prirodnim proizvodima kao što je med, koji ima sve veću primjenu u konvencionalnoj medicini kao licencirani medicinski proizvod u obliku sterilnih zavoja ili u sterilnim tubama [100].

Mehanizam zacjeljivanja rana pomoću meda nije do kraja razjašnjen, ali uključuje učinak više sustava. Tablica 8. opisuje učinke meda odgovorne za kliničke ishode te pretpostavljeni mehanizam tih ishoda, koji se temelji na *in vitro* istraživanjima, životinjskim modelima i kliničkim podacima. Indikacije za primjenu manuka meda su prljave, vlažne ili nekrotične rane (koje zahtijevaju uklanjanje odumrlog tkiva i tretiranje infekcije), opekotine, apscesi (potreban antimikrobni i protuupalni učinak) [159].

Tablica 8. Učinci i svojstva meda manuke, predviđeni klinički ishodi i pretpostavljeni mehanizam djelovanja kod zacjeljivanja rana [5, 92].

UČINAK I SVOJSTVO	PREDVIĐENI KLINIČKI ISHOD	PRETPOSTAVLJENI MEHANIZAM DJELOVANJA
Antimikrobni	- sterilizacija - inhibicija potencijalnih patogena - inhibicija proteolitičkih enzima, toksina i bakterijskih antigena - deodorira (uklanja neugodan miris)	- nastanak H_2O_2 - neperoksidna aktivnost MGO i drugih spojeva - Bakterije prisutne u rani kao izvor energije koriste glukozu (visoka konc. u medu) umjesto aminokiselina iz seruma i mrtvih stanica. Nastaje mliječna kiselina, umjesto amonijaka, amina i sumpornih spojeva koji uzrokuju neugodan miris.
Antiinflamatorni	Smanjenje: - edema - eksudata	- reducira broj leukocita na mjestu rane; smanjuje slobodne radikale koji uništavaju stijenke kapilara i usporavaju zacjelji-

	- erozija - keloida - ožiljaka - zadebljanje opekotina (keratolitički učinak) - boli (analgetski učinak)	vanje - smanjuje stvaranje prostaglandina odgovornih za bol, vazodilataciju, oticanje okolnog tkiva, smanjenje protoka u kapilarama, otvaranje stijenki kapilara - smanjuje pretjerano stvaranje fibroblasta, što bi rezultiralo zadebljanjem tj. keloidima i ožiljcima
Imunostimulacijski	-inhibicija potencijalnih patogena -stimulacija fagocitoze	- potiče nastanak velikog broja makrofaga koji stvaraju H_2O_2 - stvara supstrate glikolize, što je značajan mehanizam za stvaranje energije u makrofagima te za njihovu funkciju u oštećenom tkivu i eksudatu gdje je manjak kisika - stimulira B i T-limfocite, aktivira neutrofile, aktivira monocite koji oslobađaju citokine koji potiču prirođeni imuni sustav da odgovori na infekciju
Antioksidacijski	- antiinflamatorno - smanjenje daljnjeg oštećenja	- inhibira regrutaciju leukocita; smanjuje upalu - hvatanje slobodnih radikala - inhibicija nastanka slobodnih radikala
Stimulacija staničnog rasta	<u>Stimulira</u> - granulaciju tkiva - reepitelizaciju - sintezu kolagena - povećanje elasticiteta kolagena - angiogenezu	- glikolizirani proteini meda i neki dr. spojevi stimuliraju makrofage - fibroblasti stvaraju novo vezivno tkivo i zatvaraju ranu - epitelne stanice stvaraju na površini rane i u kapilarama novi epitel
Održavanje rane vlažnom	<u>Stimulira:</u> - reepitelizaciju tkiva - proteolitičko uklanjanje mrtve kože - granulaciju tkiva - staničnu proliferaciju - čišćenje rane	- epitelnim stanicama, koje na površini rane stvaraju novi sloj epitelnih stanica, potrebni su vlažni uvjeti za rast - omogućuje djelovanje proteaza; čisti ranu, uklanja kraste, gnoj i mrtve stanice - fibroblasti (rudimentarni oblik mišićnih stanica) potrebni su vlažni uvjeti kako bi kontrahirali, skupili rubove rane te ju zatvorili. - zavoj s medom bezbolno se ukloni; ne povlači novonastalo tkivo kao suhi zavoji
Nutritivne tvari	- reepitelizacija - stimulacija fagocitoze	-Med direktno opskrbljava ranu neophodnim nutrijentima, kao što su šećeri (med je prezasićena otopina šećera), aminokiseline, vitamini i esencijalni minerali. - Opskrba glukozom je od izuzetne važnosti za epitelne stanice koje moraju stvoriti zalihu ugljikohidrata kako bi imale dovoljno energije za migraciju preko površine rane te posljedično obnovu kože.

Osmolarnost	- čišćenje rane - povećanje dotoka hranjivih tvari - povećanje opskrbe tkiva kisikom	- visoki osmotski tlak povlači tekućinu iz rane ispod zavoja meda; nastaje sloj tekućine koji je razrijeđena otopina meda u plazmi ili limfi - otjecanjem limfe rana se čisti, povećan je konstantni dotok hranjivih tvari funkcionalnim krvnim žilama dublje u ranu
Nizak pH (kiselost)	- povećanje opskrbe tkiva kisikom - ubrzano zacjeljivanje rane - blago zakiseljavanje rane - inhibicija potencijalnih patogena	- kiselo okruženje ubrzava zacjeljivanje - konverzija toksičnog amonijaka, NH_3 (nastaje u rani bakterijskom razgradnjom proteina) u netoksični ionizirani oblik NH_4^+ koji dominira u kiselim uvjetima - blaže djelovanje meda kao sredstva za zakiseljavanje rana zbog glukonske kiseline (kiseli spoj meda); prisutna u obliku neutralnog laktona koji sporo konvertira u oblik slobodne kiseline - pomaže makrofagima u uništavanju bakterija; nizak pH unutar fagocitne vakuole uključen u ubijanje ingestiranih bakterija
Viskoznost	- sprječavanje prodiranja patogena	- med stvara zaštitnu barijeru

5.4.4. Mehanizam citotoksične aktivnosti

Pretpostavljeno je par mehanizama antitumorskog učinka meda manuke:

1. apoptoza tumorskih stanica depolarizacijom membrane mitohondrija
2. inhibicija ciklooksigenaze-2 (COX-2) različitim spojevima (npr. flavonoidima)
3. oslobađanje citotoksičnog H_2O_2
4. hvatanje ROS fitokemikalijama iz meda

MGO se može deteminirati kao citotoksična tvar koja ima potencijalno antitumorsko djelovanje. MGO reagira s proteinima, DNA i RNA te utječe na njihovu strukturu i funkciju. Posljedično, antioksidacijski enzimi su inhibirani, određeni procesi se ne odvijaju te dolazi do oštećenja u stanici. Moguća je i inhibicija lanca transporta elektrona na membrani mitohondrija tj. inhibicija staničnog disanja. Nadalje, nerazgrađeni nusproizvodi, zbog prisutnosti MGO, mogu oštetiti stanicu. Dolazi do paralelnog stvaranja slobodnih radikala koji izazivaju apoptozu stanice. Može doći do novih MGO-DNA spojeva i pucanja DNA te stvaranja križnih veza („crosslinks“). I drugi 1,2-dikarbonilni spojevi imaju potencijalni citotoksični učinak.

Kao i kod MGO, citotoksičnost se temelji na promjeni DNA i nastanku unutarstaničnog stresa [63].

Citotoksični učinak se određuje IC_{50} vrijednošću. Ona označuje koncentraciju testiranog agensa koji inhibira rast stanice za 50%.

5.4.5. Pretpostavljeni mehanizmi djelovanja meda manuke u različitim indikacijama

Gastroenterologija

Med manuke intenzivno se istražuje za gastroenterološke indikacije. Nove formulacije kompleksa manuka meda potencijalno bi povećale učinak na infekcije u gastrointestinalnom traktu. Kompleksiranjem bi se povećala dostupnost djelatnih tvari na mjestu infekcije i produžilo oslobađanje djelatnih tvari meda manuke, čime bi antibakterijska aktivnost bila održana kroz duži vremenski period (npr. kompleks α-ciklodekstrina s manuka medom) [97].

Pretpostavljena su tri mehanizma meda za gastroenterološke indikacije:

1. stimulacija senzornih živaca u želudcu osjetljivih na kapsaicin (iritans chilli paprike) – oslobađaju se vazodilatacijski peptidi, posredstvom dušikovog oksida, povećavaju opskrbu krvi što štiti intestinalnu mukozu
2. zaštita i povećanje neproteinskih sulfhidrila (tvari kao što je glutation; dio antioksidacijskog obrambenog sustava tijela) i antiinflamatorni učinak - smanjuju nastanak i djelovanje slobodnih radikala
3. Stimulacija reepitelizacije – smanjenje edema i granulacija intestinalne mukoze [111]

Antivirusna aktivnost

Med ulazi u virus i inhibira njegovu replikaciju te pri odgovarajućoj koncentraciji ga neutralizira [160].

Antifungalna aktivnost

Med manuke djeluje protiv dermatofita svojom neperoksidnom aktivnošću, dok druge vrste meda peroksidnom aktivnošću.

Oftalmologija

Djelotvornost meda kod bolesti oka pripisuje se njegovom antibakterijskom, antifungalnom i protuupalnom učinku te je iritans oka, stoga moguće potiče procese zacjeljivanja oka.

Kardiovaskularni sustav

Antioksidacijski i protuupalni učinak meda pozitivno djeluju na kardiovaskularni sustav.

Kašalj

Med stvara kontaktni umirujući učinak i zbog slatkih komponenti potiče salivaciju te prekriva sluznicu koju na taj način štiti od iritansa, uzročnika suhog, neproduktivnog kašlja.

Usna šupljina

Visoki sadržaj MGO korelira s jakim antibakterijskim učinkom meda manuke, stoga je MGO mogući razlog uklanjanja anaerobnih bakterija u ustima, glavnih uzročnika halitioze.

Sportski rezultati

1. opskrba organizma kombinacijom glukoze i fruktoze – pogodnija za prevenciju umora i postizanje boljih sportskih rezultata od konzumacije šećera pojedinačno
2. opskrba organizma vitaminima i mineralima, posebno vitaminima B skupine (B1 i B6) i minerala važnih za prijenos impulsa, Ca, Mg, Zn i dr.

5.5. Nuspojave i kontraindikacije primjene meda u medicinske svrhe

Kontraindiciran je kod pacijenata s prethodnom anafilaktičkom reakcijom na pčelinji otrov i druge pčelinje proizvode.

Na početku primjene meda na ranu moguća je blaga prolazna nelagoda, osjećaj žarenja, koji nestaje nakon par aplikacija, a može se i reducirati miješanjem meda s hidrogelom do 50% (povećava pH ka normali bez velikog gubitka antimikrobnog učinka) [92].

Postoji hipotetski rizik infekcije rane medom pošto može sadržavati spore *Clostridia* (botulizam rane). Nije bilo zabilježenih slučajeva, no kad bi spore i klijale, vegetativne stanice *Clostridia*, koji su obligatorni anaerobi, teško bi preživjele uz H_2O_2 iz meda. No gama zračenjem meda, uklanjaju su spore *Clostridia* bez gubitka antibakterijske aktivnosti meda [161].

Postoji rizik od povećanja glukoze u krvi (GUK) kod dijabetičara. Oralnom primjenom meda za liječenje GIT infekcija postoji rizik, ali manje povisuje GUK od obično primje-

njivanog šećera jer se sporije apsorbira u crijevu [162]. Topikalnom primjenom meda, na veće rane, nije zamijećeno povećanje GUK.

6. ZAKLJUČCI

Apiterapija je dio tradicionalne i komplementarne medicine koja primjenjuje pčelinje proizvode (med, pelud, matična mliječ, vosak, propolis i apitoksin) u svrhu prevencije i liječenja bolesti.

Prvi registrirani „medicinski med“ i danas jedan od najistraživanijih vrsta meda je manuka med. To je tamni, monoflorni med dobiven iz manuka biljke, *Leptospermum scoparium*, koja raste kao grm ili stablo na Novom Zelandu i u istočnoj Australiji.

S kemijskog stajališta, med je prezasićena otopina šećera, ali ipak kompleksnog sastava zbog mnogobrojnih tvari prisutnih u malim koncentracijama. Ugljikohidrati mogu činiti od 73 do 83% meda, uglavnom monosaharidi fruktoza i glukoza, a u mnogo manjoj frakciji disaharidi, trisaharidi i oligosaharidi kao što su saharoza, maltoza i melecitoza. Zakonski med smije sadržavati do 20% vode, pošto sa sadržajem vode proporcionalno raste i broj mikroorganizama, a time i fermentacija meda. U medu manuke je izmjereno 17,8% vode. Udio proteina i aminokiselina u medu je nizak, ali je spektar esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina raznolik. Prolin čini najveći dio aminokiselina u medu, a od značaja je i antibakterijski peptid defenzin-1. Važnu ulogu imaju enzimi u medu kao što su dijastaza i invertaza (za procjenu termičke obrade meda), glukoza oksidaza (katalizira nastajanje H_2O_2) te katalaza (razgrađuje H_2O_2). Karbonilni spoj 5-hidroksimetilfurfural (HMF) je parametar kvalitete meda, može ukazati na zagrijavanje ili predugo skladištenje meda, a smije ga biti do 40 mg/kg meda. U manuka medu je identificirano 16 minerala, a najzastupljeniji je kalij. Manuka med je slabo kiseo s pH od 3,57 do 4,21, a glukonska kiselina je glavna kiselina u medu.

Antioksidansi su velika skupina fitokemikalija koji djeluju kao hvatači slobodnih radikala, štiteći stanice od oksidativnog stresa. Mogu biti enzimski (glukoza oksidaza, katalaza) i neenzimski (organske kiseline, produkti Maillard-ovih reakcija, aminokiseline, proteini, flavonoidi, fenoli, vitamini E i C, karotenoidi). Metil-siringatu (MSYR), kod manuka meda, pripisuje se antioksidacijski učinak. Manuka med sadrži najveći udio polifenola, a u najvećoj mjeri su to flavonoidi i fenolne kiseline, kao što su pinocembrin, pinobanksin, galangin, krizin, cimetna, fenilmliječna, kojična i galna kiselina, metil-siringat, 2-metoksibenzojeva kiselina, luteolin i kvercetin.

1,2-Dikarbonilni spojevi, odgovorni za neperoksidnu aktivnost meda manuke, su glioksal (GO), 3-deoksiglukozon (3-DG) i metilglioksal (MGO). Sadrži izuzetno visok sadržaj MGO, od 38 do 828 mg/kg što je i do sto puta više od drugih vrsta meda.

Kako se manuka med smatra medicinskim proizvodom od posebnog značaja zbog svoje antimikrobne aktivnosti, nužno je determinirati botaničko podrijetlo putem cvjetnih markera, a dijelimo ih na hlapljive i nehlapljive. Hlapljivi spojevi manuka meda su 2-metilbenzofuran, 2'-hidroksiacetofenon i 2'-metoksiacetofenon. Nehlapljivi spojevi su leptosperin, lepteridin, kojična kiselina i dr.

Melisopalinologija je tradicionalna kvalitativna i kvantitativna metoda određivanja kvalitete i botaničkog podrijetla meda analizom peludnih zrnaca. Pošto je teško diferencirati peludna zrnca manuka, kanuka, a i „jellybush" meda, navedena metoda nije primjenjiva za određivanje botaničkog podrijetla manuka meda. Reološkim ispitivanjem mogu se razlikovati manuka i kanuka med; manuka pokazuje svojstvo tiksotropnosti, a kanuka med je tipični newtonski fluid.

Terapijska primjena meda manuke je raznolika, ali najznačajnija je njegova antimikrobna aktivnost kod tretiranja raznovrsnih rana i opekotina. Posjeduje peroksidnu antibakterijsku aktivnost zbog vodikovog peroksida, a neperoksidna dolazi od metilglioksala (minimalno 100 mg/kg), defenzina-1, polifenola, još neindentificiranih fitokemikalija, niskog pH i osmolarnosti. Ukupna antibakterijska aktivnost mjeri se sadržajem MGO u medu ili vrijednošću UMF (*eng.* unique manuka factor). Manuka med djeluje na široki spektar bakterija, a osjetljive su i bakterije koje su rezistentne na prvu liniju antibiotika, kao što su MRSA, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* i *Staphylococcus epidermidis*.

Med manuke je pokazao djelotvornost kod tretiranja rana zbog svog antimikrobnog, antiinflamatornog, imunostimulacijskog i antioksidacijskog učinka. Ubrzava zacjeljivanje rane održavajući ranu vlažnom i opskrbljujući je nutritivnim tvarima. Djeluje sinergistički s antibioticima (tetraciklin, rifampicin, mupirocin, imipenem) koji se koriste kod rana inficiranih bakterijama rezistentnim na mnoge antibiotike, npr. MRSA. Indiciran je za prljave, vlažne ili nekrotične rane, apscese, opekotine te za radioterapijom oštećeno tkivo.

Dokazan je i antiproliferativni učinak meda manuke na melanomu, kolorektalnom karcinomu i karcinomu dojke, a učinak ovisi o vremenu i dozi meda manuke. Ublažava nuspojave onkoloških tretmana.

Ima i jaki imunostimulacijski učinak, stimulirajući limfocite T i B.

Antiinflamatorni učinak je usko povezan s antioksidacijskim pošto se sa smanjenjem upale smanjuje stvaranje slobodnih radikala, a time i oštećenje tkiva.

U gastroenterologiji skraćuje trajanje dijareje uzrokovane bakterijom te može zamjeniti glukozu u oralnim rehidracijskim otopinama (ORS). Konzumiranjem meda prije jela smanjuje se pobol od dispepsije, gastritisa te ulkusa. Poboljšava probavu i apsorpciju hranjivih tvari pošto sadrži određene enzime, djeluje kao probiotik i prebitok (sadrži oligosaharide).

Pokazuje i antivirusni učinak djelujući na labijalni i genitalni herpes, gripu, prehladu i osip uzrokovan varicella-zoster virusom (VZV).

Kao antimikotik djeluje na razne dermatofite te *Candidu albicans*, najčešćeg uzročnika infekcija genitalnog sustava kod žena.

Stvaranjem nepogodnih uvjeta zbog svog kiselog pH, inhibira rast parazita.

Ima brojne indikacije u oftalmologiji (keratitis, konjuktivitis, blefaritis, kemijski inducirana katarakta) zbog svog antibakterijskog, antifungalnog i protuupalnog učinka.

Djeluje pozitivno na kardiovaskularni sustav zbog svog antioksidacijskog i protuupalnog učinka.

Dijabetičarima može poslužiti u regulaciji poremećenog metabolizma i u usporavanju komplikacija dijabetesa.

U središnjem živčanom sustavu djeluje kao anksiolitik, antidepresiv, neuroprotektivno te poboljšava kapacitet pamćenja.

Pomaže i kod suhog, neproduktivnog kašlja djelujući umirujuće i poticanjem salivacije.

Med manuke smanjuje plak i broj bakterija u usnoj šupljini, liječi oralne lezije, aftozni stomatitis, rekurentni herpes labialis, rekurentni intraoralni herpes, atrofični/erozivni oralni lichen planus, oralnu kandidijazu, oralnu psorijazu te halitioze na temelju antibakterijskog učinka na anerobe.

Med je dobar za sportaše jer je brz izvor energije (glukoza) te olakšava održavanje razine glukoze u krvi, oporavak mišića i obnovu glikogena nakon vježbanja.

Med se ne smije koristiti kod dojenčadi do prve godine života zbog mogućeg botulizma. Kad je zastupljen u dječjoj prehrani poboljšava pamćenje i rast, krvnu sliku, djeca su manje podložna bolestima i probavnim smetnjama te poboljšava djelovanje djeteta kasnije u životu.

Potencijalni učinak meda na plodnost temelji se na njegovom djelovanju na hormone testosteron, LH, FSH i kortizol.

Med se od davnina koristio u kozmetičke svrhe. Prikladan je za sve tipove kože, hidratizira, omekšava i zacjeljuje kožu.

Kontraindiciran je kod ljudi s prethodnim anafilaktičkim reakcijama na pčelinje proizvode.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Zumla A, Lulat A. Honey – a remedy rediscovered. J R Soc Med. 1989 Jul; 82(7): 384–385.

2. Jones R. Honey and healing through the ages. U: Munn P, Jones R. Cardiff, UK: IBRA. International Bee Research Association. 2001. str. 1-4.

3. Eteraf-Oskouei T, Najafi M. Traditional and Modern Uses of Natural Honey in Human Diseases: A Review. Iran J Basic Med Sci. 2013 Jun; 16(6): 731–742.

4. Beck DF, Smedley D. Honey and Your Health: A Nutrimental, Medicinal and Historical Commentary. Silver Spring: Health Resources Inc.; 1997.

5. Bogdanov S. Honey in medicine. Bee Product Science; 2014. str. 1-16.

6. White JW, Subers MH, Schepartz AI. The identification of inhibine the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. Biochem. Biopysi. Acta. 1963; 73: 57-79.

7. Schweizerischer Apitherapie Verein - SAV. Schöfflisdorf: Schweizerischer Apitherapie Verein – SAV; 2015. Dostupno na: www.apitherapie.ch, 23. kolovoza 2017.

8. Deutscher Apitherapiebund e.V. (D.A.B). Weilheim-Marnbach: Deutscher Apitherapiebund e.V. (D.A.B). Dostupno na: www.apitherapie.de, 23. kolovoza 2017.

9. Hellner M, Winter D, von Georgi R, Münstedt K. Apitherapy: Usage And Experience In German Beekeepers. Evid Based Complement Alternat Med. 2008 Dec; 5(4): 475–479.

10. Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Kaźmierczak J, Mencner L, Olczyk K. Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. Evid Based Complement Alternat Med. 2015; 2015.

11. Krell R. Value-added products from beekeeping. FAO agricultural services bulletin No. 124. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome; 1996.

12. Morita H, Ikeda T, Kajita K, Fujioka K, Mori I, Okada H, et al. Effect of royal jelly ingestion for six months on healthy volunteers. Nutr J. 2012; 11: 77.

13. Fratini F, Cilia G, Turchi B, Felicioli A. Beeswax: A mini review of its antimicrobial activity and its application in medicine. Asian Pac J Trop Med. 2016 Sep; 9(9):839-43.

14. Sforcin JM. Biological properties and therapeutic applications of propolis. Phytother Res. 2016 Jun; 30(6):894-905.

15. Khalil ML. Biological activity of bee propolis in health and disease. Asian Pac J Cancer Prev. 2006 Jan-Mar; 7(1):22-31.

16. Graça Miguel M, Dulce Antunes M. Is propolis safe as an alternative medicine?. J Pharm Bioallied Sci. 2011 Oct-Dec; 3(4): 479–495.

17. Bankova V. Recent trends and important developments in propolis research. Evid Based Complement Alternat Med. 2005 Mar; 2(1): 29–32.

18. Wagh VD. Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. Adv Pharmacol Sci. 2013; 2013: 308249.

19. Hwang DS, Kim SK, Bae H. Therapeutic effects of bee venom on immunological and neu-rological diseases. Toxins (Basel). 2015 Jun 29;7(7):2413-21.

20. Liu XD, Zhang JL, Zheng HG, Liu FY, Chen Y. Clinical randomized study of bee-sting therapy for rheumatoid arthritis. Zhen Ci Yan Jiu. 2008 Jun; 33(3):197-200.

21. Leandro LF, Mendes CA, Casemiro LA, Vinholis AH, Cunha WR, de Almeida R, et al. Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A_2 of honey bee (Apis mellife-ra) venom against oral pathogens. An Acad Bras Cienc. 2015 Mar; 87(1):147-55.

22. Kapš P. Liječenje pčelinjim proizvodima – apiterapija. Sveta Nedelja: Geromar; 2013.

23. Kuštrak D. Fitofarmacija i farmakognozija. Zagreb: Golden Marketing - Tehnička knjiga; 2005. str. 84-88.

24. Ministarstvo poljoprivrede. Pravilnik o medu. Narodne novine; 2015. br. dokumenta u izdanju 1029.

25. Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva. Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda. Narodne novine. 2000; br. dokumenta u izdanju 280.

26. Cramp D. Pčelarstvo. Rijeka: Leo-commerce; 2012.

27. Benjamin A, McCallum B. Uzgoj pčela i izrada meda. Rijeka: Leo-commerce; 2010.

28. Stephens J. The factors responsible for the varying levels of UMF® in mānuka (Leptos-permum scoparium) honey. Hamilton: University of Waikato; 2006.

29. Alvarez-Suarez JM, Gasparrini M, Forbes-Hernández TY, Mazzoni L, Giampieri F. The composition and biological activity of honey: A focus on Manuka honey. Foods. 2014 Jul 21 ;3(3):420-432.

30. EU Council Directive. 2002. Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey.Off J Eur Commun L10:47–52.

31. Bubalo D. Pelud, botaničko i zemljopisno porijeklo meda. Dostupno na: www.pcelinjak.hr, 7. rujna 2017.

32. Kaškoniene V, Venskutonis PR. Floral markers in honey of various botanical and geographical origins: A review. Comprehensive reviews in Food Sci Food Saf. 2010 Nov; 9(6): 620-634.

33. AIRBONE'S New Zealands Honey Collection: Manuka honey. Dostupno na: www.airborne.co.nz/manuka.shtml, 7. rujna 2017.

34. Vahčić N, Matković D. Kemijske, fizikalne i senzorske značajke meda; 2009. Dostupno www. pcelinjak.hr, 7. rujna 2017.

35. Ministry for Primary Industries. Options for defining monofloral manuka honey. MPI Discussion Paper No: 2013/38.

36. Jerković I, Radonić A. Praktikum iz organske kemije. Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu; 2009.

37. Sutlović D. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011.

38. Luterotti S. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Dostupno na: http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm, 7. rujan 2017.

39. Pisoschi AM, Negulescu GP. Methods for total antioxidant activity determination: A review. Biochem & Anal Biochem. 2011;1:106.

40. Strasburg G, Ludescher RD. Theory and applications of florescence spectroscopy in food research. Trends in Food Science and Technology. 1995;6(3):69–75.

41. Lenhardt L, Zeković I, Dramićanin T, Dramićanin MD, Bro R. Determination of the botanical origin of honey by front-face synchronous florescence spectroscopy. Applied Spectroscopy. 2014;68(5):557–563.

42. Kalenić S, Mlinarić-Missoni E. Medicinska bakteriologija i mikologija. Zagreb: Merkur A.B.D.; 2005.

43. Allen KL, Molan PC, Reid GM. A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. J Pharm Pharmacol. 1991; 3:817–22.

44. Beretta G, Granata P, Ferrero M. Orioli M, Facino M. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrofotometric/fluorimetric assays and chemometrics. Analytica Chimica Acta. 2005; 533:185-191.

45. Garcia EJ, Oldoni TLC, Alencar SM, Reis A, Loguercio AD, Grande RHM. Antioxidant Activity by DPPH• Assay of Potential Solutions to be Appliedon Bleached Teeth. Brazilian Dental Journal. 2012; 1:22-27.

46. Escuredo OM, Fernández-González M, Sejio CM. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. Food Chemistry. 2012; 138: 851-856.

47. Zappalá M, Fallico B, Arena E, Verzera A. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. Food Control. 2005; 16:273-277.

48. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS•+ radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine. 1999; 26(9-10):1231-1237.

49. Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 5. überarb. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 2001.

50. White JW, Rudyj ON. The protein content of honey. J. Apic. Res. 1978; 17: 234-238.

51. Beckh G, Wessel P, Lüllmann C. Natürliche Bestandteile des Honigs – Hefen und deren Stoffwechselprodukte. Teil 2: Der Wassergehalt und die Wasseraktivität als Qualitätsparameter mit Bezug zum Hefewachstum. Dtsch. Lebensm. Rdsch. 2004; 100: 14-17.

52. Vanhanen LP, Emmertz A, Savage GP. Mineral analysis of mono-floral New Zealand honey. Food Chem. 2011; 128: 236-240.

53. Doner LW. The sugars of honey – a review. J. Sci. Food Agric. 1977; 28: 443-456.

54. Deifel A. Die Chemie des Honigs. Chemie in unserer Zeit. 1989; 23: 25-33.

55. Ahmed S, Othman NH. Review of the Medicinal Effects of Tualang Honey and a Comparison with Manuka Honey. Malays J Med Sci. 2013 May; 20(3): 6–13.

56. Weston RJ. Brocklebank LK. The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. Food Chem. 1999, 64: 33-37.

57. Bogdanov S. Bestimmung von Honigprotein mit Coomassie Brilliantblau G250, Mitteilungen Leb. Hyg. 1981; 72: 411-417.

58. White JW. Honey. Advances in Food Res. 1978; 24: 287-374.

59. Won S, Lee D, Ko SH, Kim J, Rhee H. Honey major protein characterization and its appli-cation to adulteration detection. Food Res. Int. 2008; 41: 952-956.

60. Kwakman PHS, te Velde AA, de Boer L, Speijer D, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Zaat SAJ. How honey kills bacteria. FASEB J. 2010; 24: 1-7.

61. White JW, Subers MH, Schepartz AI. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. Biochim. Biophys. Acta. 1963;73: 57-70.

62. Ivanov T. Activity of glucose oxidase, catalase and proteolytic enzymes and the inactivation of enzymes in honey by heating and preservation. Zhivotnov"dni Nauki. 1981;18: 119-125.

63. Atrott J. Methylglyoxal in Manuka-Honig (Leptospermum scoparium): Bildung, Wirkung, Konsequenzen. Dissertation. 2013.

64. Cotte JF, Casabianca H, Giroud B, Albert M, Lheritier J, Grenier-Loustalot MF. Characterization of honey amino acid profiles using high-pressure liquid chromatography to control authenticity. Anal. Bioanal. Chem. 2004; 378: 1342-1350.

65. Iglesias MT, Martin-Alverez PJ, Polo MD, De Lorenzo C, Gonzalez M, Pueyo E. Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature. J. Agric. Food Chem. 2006; 54: 9099-9104.

66. Linden T, Cohen A, Deppisch R, Kjellstrand P, Wieslander A. 3,4-Dideoxyglucosone-3-ene (3,4-DGE): A cytotoxic glucose degradation product in fluids for peritoneal dialysis. Kidney Int.2002; 62; 697-703.

67. Mavric E, Wittmann S, Barth G, Henle. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (Leptospermum scoparium) honeys from New Zealand. Mol. Nutr. Food Res. 2008; 52: 483-489.

68. Ajlouni S, Sujirapinyokul P. Hydroxymethylfurfuraldehyde and amylase contents in Australian honey. Food Chem. 2010; 119: 1000-1005.

69. Villamiel M, del Castillo MD, Corzo N, Olano A. Presence of furosine in honeys. J. Sci. Food Agric. 2001; 81: 790-793.

70. Brudzynski K, Miotto D. The relationship between the content of Maillard reaction-like products and bioactivity of Canadian honeys. Food Chem. 2011; 124; 869-874.

71. Agbagwa OE, Otokunefor TV, Frank-Peterside N. Quality assessment of Nigeria honey and manuka honey. J. Microbiol. Biotech. Res. 2011;1: 20-31.

72. Isidorov VA, Czyżewska U, Jankowska E, Bakier S. Determination of royal jelly acids in honey. Food Chem. 2011; 124: 387-391.

73. Oelschlaegel S, Gruner M, Wang P, Boettcher A, Koelling-Speer I, Speer K. Classification and characterization of Manuka honeys based on phenolic compounds and methylglyoxal. J. Agric. Food Chem. 2012; 60: 7229-7237.

74. Kesić A, Crnkić A, Ibrišimović-Mehmedinović N, Šestan A, Ćatović B. Changes of antioxidant activity in honey as a result of Haber-Wais reaction. Am. J. App. Chem. 2014; 2(6): 112-116.

75. Inoue K, Murayama S, Seshimo F, Takeba K, Yoshimura Y, Nakazawa H. Identification of phenolic compound in manuka honey as specific superoxide anion radical scavenger using electron spin resonance (ESR) and liquid chromatography with coulometric array detection. J. Sci. Food Agric. 2005 Apr 15; 85(5): 872-878.

76. Kazazić SP. Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. Arh Hig Rada Toksikol. 2004; 55:279-290.

77. Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Battino M. Honey as a source of dietary antioxidants: structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. Curr Med Chem. 2013; 20(5):621-38.

78. Alzahrani HA, Boukraa L, Bellik Y, Abdellah F, Bakhotmah BA, Kolayli S, Sahin H. Evaluation of the antioxidant activity of three varieties of honey from different botanical and geographical origins. Glob J Health Sci. 2012 Nov;4(6):191-196.

79. Stephens JM, Schlothauer RC, Morris DB, Yang D, Fearnley L, Greenwood D, et al. Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand manuka and kanuka honeys. Food Chemistry. 2010;120(1):78–86.

80. Yao L, Datta N, Tomás-Barberán FA, Ferreres F, Martos I, Singanusong R. Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand Leptospermum honeys. Food Chemistry. 2003; 81:159–168.

81. Daher S, Gülaçar FO. Identification of new aromatic compounds in the New Zealand manuka honey by gas chromatography mass spectrometry. E-J. Chem. 2010;7:7-14.

82. Adams CJ, Boult CH, Deadman BJ, Farr JM, Grainger MN, Manley-Harris M, Snow MJ. Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (Leptospermum scoparium) honey. Carbohydr Res. 2008 Mar 17; 343(4):651-9.

83. Windsor S, Pappalardo M, Brooks P, Williams S, Manley-Harris M. A convenient new analysis of dihydroxyacetone and methylglyoxal applied to Australian Leptospermum honeys. J. Pharm. Phyto. 2012; 4: 6-11.

84. Beitlich N, Koelling-Speer I, Oelschlaegel S, Speer K. Differentiation of manuka honey from kanuka honey and from jelly bush honey using HS-SPME-GC/MS and UH-PLC-PDA-MS/MS. J.Agric. Food Chem. 2014; 62(27):6435–6444.

85. Jerković I, Tuberoso C, Kasum A, Marijanović Z. Volatile compounds of Asphodelus microcarpus Salzm. et Viv. Honey obtained by HS-SPME and USE analyzed by GC/MS. Chem Biodivers. 2011 Apr;8(4):587-98.

86. Cuevas-Glory LF, Pino JA, Santago LS, Sauri-Duch E. A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. 2007; 103 (3): 1032-1043.

87. Senanayake MJ. A chemical investigation of New Zealand unifloral honeys. The University of Waikato, New Zealand. 2006.

88. Stephens JM, Greenwood DR, Fearnley L, Bong J, Schlothauer RC, Loomes KM. Honey production and compositional parameters. In: Preedy VR, editor. Processing and impact

on active components in food. London, United Kingdom: Academic Press; 2015. pp. 675–680.

89. Lin B, Loomes KM, Prijic G, Schlothauer R, Stephens JM. Lepteridine as a unique fluorescent marker for the authentication of manuka honey. Food Chem. 2017 Jun 15;225:175-180.

90. Bong J, Prijic G, Braggins TJ, Schlothauer RC, Stephens JM, Loomes KM. Leptosperin is a distinct and detectable fluorophore in Leptospermum honeys. Food Chem. 2017 Jan 1;214:102-9.

91. Pyrzynska K, Biesaga M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. Trends in analytical chemistry. 2009; 28 (7).

92. Molan P. Why honey is effective as a medicine. Bee World. 2001;82(1): 22-40.

93. Kurtagić H. Polifenoli i flavonoidi u medu. Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku. 2017;6 (1):28-35.

94. Jubri Z, Rahim NB, Aan GJ. Manuka honey protects middle-aged rats from oxidative damage. Clinics (Sao Paulo). 2013 Nov;68(11):1446-54.

95. Cooper RA, Jenkins L, Henriques AF, Duggan RS, Burton NF. Absence of bacterial resistance to medical-grade manuka honey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010 Oct;29(10):1237-41.

96. Atrott J, Henle T. Methylglyoxal in manuka honey - correlation with antibacterial properties. Czech J. Food Sci. 2009; 27.

97. Swift S, Chepulis LM, Uy B, Radcliff FJ. Enchanced antibacterial activity of MGO Manuka honey complexed with α-cyclodextrin (Manuka Honey with CycloPower). Functional Foods in Health and Disease, 2014; 4 (5): 172 – 181.

98. Kwakman PHS, Velde AA, Boer L, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Zaat SAJ. Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. 2011 Mar 4. Dostupno na: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017709. 12. rujna 2017.

99. Blair SE, Cokcetin NN, Harry EJ, Carter DA. The unusual antibacterial activity of medical-grade Leptospermum honey: antibacterial spectrum, resistance and transcriptome analysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009 Oct;28(10):1199-208.

100. Jenkins R , Cooper R. Improving Antibiotic Activity against Wound Pathogens with Manuka Honey In Vitro. PLoS One. 2012; 7(9): e45600.

101. Müller P, Alber DG, Turnbull L, Schlothauer RC, Carter DA, Whitchurch CB, Harry EJ. Synergism between Medihoney and rifampicin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). PLoS One. 2013;8(2):e57679.

102. Bang LM, Buntting C, Molan P. The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implications for wound healing. J Altern Complement Med. 2003 Apr;9(2):267-73.

103. Efem SE. Clinical observations on the wound healing properties of honey. Br J Surg. 1988 Jul;75(7):679-81.

104. Cavanagh D, Beazley J, Ostapowicz F. Radical operation for carcinoma of the vulva. A new approach to wound healing. Journal of Obstetrics and Gynaecology. 1970; 77:1037-1040.

105. Smirnova II, Filatova EI, Suvorov AN, Bylinskaia EN. The use of therapeutic/prophylactic dragee "honey laminolact" in radiotherapy of uterine tumors. Voprosy Onkologii. 2000; 46(6):748-750.

106. Bardy J, Slevin NJ, Mais KL, Molassiotis A. A systematic review of honey uses and its potential value within oncology care. Journal of Clinical Nursing. 2008; 17:2604-2623.

107. Zidan J, Shetver L, Gershuny A, Abzah A, Tamam S. Stein M, Friedman E. Prevention of chemotherapy-induced neutropenia by special honey intake. Medical Oncology. 2006; 23(4):549-552.

108. Ajibola A, Chamunorwa JD, Erlwanger KH. Nutraceutical values ofnatural honey and its contribution to human health and wealth. Nutrition&Metabolism. 2012; 9:61-73.

109. Haffejee IE, Moosa A. Honey in the treatment of infantile gastroenteritis. Br Med J (Clin Res Ed). 1985 Jun 22; 290(6485): 1866–1867.

110. Fordtran JS. Stimulation of active and passive sodium absorption by sugars in the human jejunum. J Clin Invest. 1975 Apr;55(4):728-37.

111. Ali AT, Chowdhury MN, Al-Humayyd MS. Inhibitory effect of natural honey on Helicobacter pylori. Tropical Gastroenterol. 1999; 12:139–143.

112. McGovern DP, Abbas SZ, Vivian G, Dalton HR. Manuka honey against Helicobacter pylori. J R Soc Med. 1999 Aug; 92(8): 439.

113. Ali ATM. Natural honey accelerates healing of indomethacin-induced antral ulcers in rats. Saudi Medical Journal. 1995; 16(2): 161-166.

114. Salem SN. Honey regimen in gastrointestinal disorders. Bull. Islamic Med. 1981;1: 358-362.

115. Luchese RH, Prudêncio ER, Fioravante Guerra A. Honey as a functional food. Honey analysis. Dostupno na: https://www.intechopen.com/books/honey-analysis/honey-as-a-functional-food. 14. rujna 2017.

116. Chick H, Shin HS, Ustunol Z. Growth and acid production by lactic acid bacteria and Bifidobacteria grown in skim milk containing honey. JFS: Food Microbiology and Safety. 2001

117. Behbahani M. Anti-Hiv-1 activity of eight monofloral Iranian honey types. Plos One. 2014. 9 (10).

118. Al-Waili NS. Topical honey application vs. acyclovir for the treatment of recurrent herpes simplex lesions. Med Sci Monit. 2004 Aug;10(8):MT94-8.

119. Watanabe K, Rahmasari R, Matsunaga A, Haruyama T, Kobayashi N. Anti-influenza viral effects of honey in vitro: potent high activity of manuka honey. Arch Med Res. 2014 Jul;45(5):359-65.

120. Pourahmad M, Sobhanian S. Effect of Honey on the Common Cold. Arch Med Res. 2009; 40(3):224-5.

121. Frolov VM, Peressadin NA. Honey against influenza and sore throat. Pcelovodstvo. 2006; 10(529):52-53.

122. Shahzad A, Cohrs RJ. In vitro antiviral activity of honey against varicella zoster virus (VZV): A translational medicine study for potential remedy for shingles. Transl Biomed. 2012; 3(2): 2.

123. Obaseiki-Ebor EE, Afonya TCA. In-vitro evaluation of the anticandidiasis activity of honey distillate (HY−1) compared with that of some antimycotic agents. J. Pharm. Pharmacol. 1984, 36: 283-284.

124. Tola N, Haile G, Mekonnen N, Furgassa W. Review on Medicinal and Nutritional Value of Bee's Honey: Senior Seminar on Animal Health. Biomedicine and Nursing 2017;3(1).

125. Emarah MH. A clinical study of the topical use of bee honey in the treatment of some occular diseases. Bull. Islamic Med. 1982; 2 (5): 422-5.

126. Rao PV, Krishnan KT, Salleh N, Ganc SH. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2016; 26(5): 657-664.

127. Yaghoobi N, Al-Waili N, Ghayour-Mobarhan M, Parizadeh SM, Abasalti Z, Yaghoobi Z, et al. Natural honey and cardiovascular risk factors; effects on blood glucose, cholesterol, triacylglycerole, CRP, and body weight compared with sucrose. Sci World J. 2008; 20:463–9.

128. Rakha MK, Nabil ZI, Hussein AA. Cardioactive and Vasoactive Effects of Natural Wild Honey Against Cardiac Malperformance Induced by Hyperadrenergic Activity. Journal of Medicinal Food. March. 2008, 11(1): 91-98.

129. Ahmed A, Khan A, Azim MK, Saeed SA, Mesaik MA, Ahmed S, Imran I. Effect of Natural Honey on Human Platelets and Blood Coagulation Proteins. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 2011; 24:389-397.

130. Chepulis L, Francis E. The glycaemic index of Manuka honey. Elsevier. 2013 Feb; 8(1): 21-24.

131. Alam F, Islam A, Gan SH, Khalil I. Honey: A Potential Therapeutic Agent for Managing Diabetic Wounds. Evid Based Complement Alternat Med. 2014; 2014: 169130.

132. Yildiz O, Karahalil F, Can Z, Sahin H, Kolayli S. Total monoamine oxidase (MAO) inhibition by chestnut honey, pollen and propolis. J Enzyme Inhib Med Chem. 2014; 29(5): 690-694.

133. Paul IM, Beiler J, Mcmonagle A, Shaffer ML, Duda L, Berlin CM. Effect of honey, dextromethorphan, and no treatment on nocturnal cough and sleep quality for coughing children and their parents. Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine. 2007;161(12):1140-1146.

134. Warren MD, Pont SJ, Barkin SL, Callahan ST, Caples TL, Carroll KN, et al. The effect of honey on nocturnal cough and sleep quality for children and their parents. Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine. 2007; 161(12):1149-1153.

135. Grobler SR, du Toit IJ, Basson NJ. The effect of honey on human tooth enamel in vitro observed by electron microscopy and microhardness measurements. Archives of Oral Biology. 1994 Feb; 39:147-153.

136. El-Haddad S, Shawaf M. Effect of honey for treatment of some common oral lesions: Follow up of 50 cases. Journal of Dentistry and Oral Hygiene. 2013; 5:55-61.

137. Atwa AA, AbuShahba RY, Mostafa M,. Hashem MI. Effect of honey in preventing gingivitis and dental caries in patients undergoing orthodontic treatment. Saudi Dent J. 2014 Jul; 26(3): 108–114.

138. Nayak PA, Nayak UA, Mythili R. Effect of Manuka honey, chlorhexidine gluconate and xylitol on the clinical levels of dental plaque. Contemp Clin Dent. 2010 Oct-Dec; 1(4): 214–217.

139. Kreider RB, Rasmussen CJ, Lancaster Sl, Kerksick C, Greenwood M. Honey: An Alternative Sports Gel. Strength Conditioning J. 2002;24: 50–51.

140. Ramenghi LA, Aerie G, Sabatino G. A palatable substance for infants: From De Rerumnatura to Evidence-Based Medicine. Eur J Pediatr. 2001;160: 677-678.

141. Chepulis LM, Starkey NJ, Waas JR, Molan PC. The effects of long-term honey, sucrose or sugar-free diets on memory and anxiety in rats. Physiol Behav. 2009 Jun 22;97(3-4):359-68.

142. Mosavat M, Kiew Ooi F, Mohamed M. ffects of honey supplementation combined with different jumping exercise intensities on bone mass, serum bone metabolism markers and gonadotropins in female rats. BMC Complement Altern Med. 2014; 14: 126.

143. SLMB. Schweizerisches Lebensmittelbuch 23A: Honig. Neuausgabe. 2004.

144. Beckmann K. Neue Ansätze in der Qualitätssicherung von Honig. Dissertation. Dresden. Technische Universität Dresden. 2008.

145. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. World Allergy Organ J. 2012 Jan; 5(1): 9–19.

146. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiol. 2006 Jun; 141(2): 312–322.

147. Grotewald E. The science of flavonoids. Ohio: Springer; 2006. str. 1-2.

148. Roberts AEL, Brown HL, Jenkins RE. On the antibacterial effects of manuka honey: mechanistic insights. Resarch and reports in Biology. 2015 Oct 29;2015(6):215-224.

149. Kalapos MP. The tandem of free radicals and methylglyoxal. Chem Biol Interact. 2008 Feb 15;171(3):251-71.

150. Stephens JM, Loomes KM, Braggins TJ, Bong J, Lin B, Prijic G. Fluorescence: A Novel Method for Determining Manuka Honey Floral Purity. Honey analysis. 2017. Dostupno na: www.intechopen.com/books/honey-analysis/fluorescence-a-novel-method-for-determining-manuka-honey-floral-purity. 2. rujan 2017.

151. Moar NT. Pollen analysis of New Zealand honey. New Zealand Journal of Agricultural Research. 1985;28(1):39–70.

152. Madden TK. The rheological properties of honey. Minerva technical bulletin. 2012.

153. Špánik I, Pažitná A, Šiška P, Szolcsányi P. The determination of botanical origin of honeys based on enantiomer distribution of chiral volatile organic compounds. Food Chemistry. 2014; 158: 497–503.

154. Bong J, Loomes KM, Schlothauer RC, Stephens JM. Fluorescence markers in some New Zealand honeys. Food Chemistry. 2016;192:1006–1014.

155. Sharma OP, Bhat TK. DPPH antioxidant assay revisited. Food Chemistry. 2009;113: 1202–1205.

156. Szweda P. Antimicrobial activity of honey. Honey analysis. Dostupno na: http://www.intechopen.com/books/honey-analysis. 12. rujan 2017.

157. Waikato Honey Research Unit. What's so special about Active Manuka Honey? Dostupno na: http://www.lmpanimalhealth.com/pdf/Active%20Manuka%20Honey.pdf. 12. rujan 2017.

158. Simon RH, Scoggin CH, Patterson D. Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. J Biol Chem. 1981 Jul 25;256(14):7181-6.

159. Hollis G. Manuka honey: exploring the Kruuse range of products. Dostupno na: https://doi.org/10.12968/vetn.2012.3.2.110. 13. rujan 2017.

160. Zeina B, Othman O, al-Assad S. Effect of honey versus thyme on Rubella virus survival in vitro. J Altern Complement Med. 1996 Fall;2(3):345-8.

161. Molan PC, Allen KL. The effect of gamma-irradiation on the antibacterial activity of honey. J Pharm Pharmacol. 1996 Nov;48(11):1206-9.

162. Katsilambros NL, Philippides P, Touliatou A, Georgakopoulos K, Kofotzouli L, Frangaki D, et al. Metabolic effects of honey (alone or combined with other foods) in type II diabetics. Acta Diabetol Lat. 1988 Jul-Sep;25(3):197-203.

8. SAŽETAK

Prvi registrirani „medicinski med“ i danas jedan od najistraživanijih vrsta meda je manuka med. To je tamni, monoflorni med dobiven iz manuka biljke, Leptospermum scoparium, koja raste kao grm ili stablo na Novom Zelandu i u istočnoj Australiji.

Fitokemikalije su tvari koje potječu iz biljaka s kojih pčele skupljaju nektar ili mednu rosu, a mogu povoljno utjecati na zdravlje čovjeka. Uspoređujući s drugim vrstama meda, manuka med sadrži najviše flavonoida i fenolnih kiselina koji djeluju kao antioksidansi te protuupalno, antiproliferativno i antimikrobno. Metilglioksal (MGO) je i do sto puta zastupljeniji u medu manuke, u usporedbi s drugim vrstama meda, te je odgovoran za njegov snažni antimikrobni učinak.

Manuka med ima razne biološke učinke i široku primjenu u komplementarnoj, ali i u konvencionalnoj medicini. Djeluje antimikrobno na široki spektar bakterija, uključujući i multirezistentne sojeve, zahvaljujući svojoj peroksidnoj i neperoksidnoj aktivnosti. Snažan je antioksidans, djeluje protuupalno, imunostimulacijski, citotoksično te kao antivirotik, antimikotik i antihelmintik. Najznačajnija je njegova primjena u tretiranju inficiranih rana i opekotina. Pozitivno djeluje na gastrointestinalni trakt, središnji živčani sustav, kod kardiovaskularnih bolesti i komplikacija dijabetesa. Dobar je u očuvanju oralnog zdravlja, brzi je izvor energije kod sportaša te vrijedna nutritivna tvar u dječjoj prehrani.

9. SUMMARY

The first registered „medicinal honey“ and today one of the most researched honeys is manuka honey. It is a dark, monofloral honey obtained from the manuka plant, *Leptospermum scoparium*, which grows as a bush or tree in New Zealand and eastern Australia.

Phytochemicals are substances that originate from plants from which honey bees collect nectar or honeydew and they can benefit the human health. When comparing to other honeys, manuka honey contains the most flavonoids and phenolic acids which are antioxidants and act anti-inflammatory, antiproliferative and antimicrobial. Methylglyoxal (MGO) is about hundredfold more present in manuka honey than in other honeys and is crucial for his strong antimicrobial action.

Manuka honey exhibits various biological effects with an extensive application in complementary, but also in conventional medicine. It acts antimicrobial on a broad bacterial spectrum, including multiresistant strains, because of its peroxide and non-peroxide activity. It is a strog antioxidant, anti-inflammatory, imunostimulating, cytotoxic but also antiviral, antifungal and antihelmintic agent. The most significant indication of manuka honey is in wound and burns treatment. It exhibits benefitial impacts on gastrointestinal tract, central nervous sytem, cardiovascular health and in diabetics, has a positive effect on reducing complications. It can be used for maintaining oral health, is a fast source of energy in sports and is a valuable nutritious substance in child's diet.