

Fitokemijske karakteristike i biološka aktivnost propolisa

Kljenak, Andrea

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:167:598105>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-21**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Andrea Kljenak

FITOKEMIJSKE KARAKTERISTIKE I BIOLOŠKA AKTIVNOST PROPOLISA

Diplomski rad

Akadska godina:

2016. / 2017.

Mentor:

prof. dr. sc. Igor Jerković

Split, listopad 2017.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET**

Andrea Kljenak

FITOKEMIJSKE KARAKTERISTIKE I BIOLOŠKA AKTIVNOST PROPOLISA

Diplomski rad

Akadska godina:

2016. / 2017.

Mentor:

prof. dr. sc. Igor Jerković

Split, listopad 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 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: -

FITOKEMIJSKE KARAKTERISTIKE I BIOLOŠKA AKTIVNOST PROPOLISA

Andrea Kljenak, 42

Sažetak: Upotreba propolisa kao smole ljekovitih svojstava poznata je još od pradavnih vremena. Propolis je smolasta smjesa koju pčele prikupljaju sa pupoljaka stabala ili kore različitih drveća te koriste u košnici. Sastoji se od oko 50% balzama i smola (flavonoidi i ostali fenolni spojevi), 30% pčelinjeg voska, 10% isparljivih spojeva, 5% peludi i 5% različitih organskih komponenti i minerala. Propolis se ne može koristiti kao sirovi materijal, već se treba pročititi ekstrakcijom s otapalima. Dokazana su mnoga biološka djelovanja propolisa: antibakterijsko, antivirusno, antigljivično, antiparazitno, antioksidacijsko, imunostimulirajuće, antitumorsko, zacjeljujuće, protuupalno, hepatoprotektivno, antiulcerozno, antihipertenzivno, anestetiko, hipoglikemijsko i dr. Najvažnije farmakološki aktivne komponente propolisa su flavonoidi, različiti fenoli te isparljivi spojevi.

Ključne riječi: propolis, flavonoidi, fenoli, antimikrobna aktivnost

Rad sadrži: 52 stranice, 14 slika, 2 tablice, 88 literaturnih citata

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: 24. listopada 2016.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u knjižnicama Kemijsko-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Splitu, Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, 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 by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. __ as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. __ and Faculty Council of School of Medicine, session no. __

Mentor: **Igor Jerković, PhD, full prof.**

Technical assistance: -

PHYTOCHEMICAL CHARACTERISTICS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF PROPOLIS

Andrea Kljenak, 42

Summary: The use of propolis as a resin with curative properties is known from ancient times. Propolis is a resinous substance collected by honeybees from leaf buds and bark of various plants and used in the hive. It is composed of 50% resin (composed of flavonoids and other phenolic compounds), 30% wax, 10% volatiles, 5% pollen and 5% various organic compounds and minerals. Propolis cannot be used as raw material, it must be purified by extraction with solvents. Many biological activities of propolis have been reported: antibacterial, antiviral, antifungal, antiprotozoan, antioxidant, immunostimulating, antitumor, tissue regenerative, anti-inflammatory, hepatoprotective, antiulcer, antihypertensive, anesthetic, hypoglycemic, etc. The most important pharmacologically active constituents in propolis are flavonoids, various phenolics and volatiles.

Key words: propolis, flavonoids, phenolics, antimicrobial activity

Thesis contains: 52 pages, 14 figures, 2 tables, 88 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: October 24, 2017.

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

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Povijest propolisa	2
1.2. Definicija propolisa	2
1.3. Sakupljanje i upotreba propolisa u košnici	3
1.4. Botanički izvor propolisa.....	3
1.5. Fizikalna i organoleptička svojstva propolisa	4
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	6
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. Ekstrakcija propolisa	9
3.2. Kemijska analiza propolisa.....	9
3.2.1. Kromatografske tehnike	9
3.2.1.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	9
3.2.1.2. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa	10
3.2.1.3. Tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti	11
3.2.2. Spektrofotometrijske metode	12
3.3. Metode određivanja antioksidacijskog djelovanja propolisa.....	14
3.4. Metode određivanja antimikrobnog djelovanja propolisa	16
4. REZULTATI.....	18
4.1. Kemijski sastav propolisa.....	19
4.1.1. Balzami i smole	19
4.1.1. Pčelinji vosak	21
4.1.3. Ugljikohidrati	21
4.1.4. Vitamini i minerali	21
4.1.5. Isparljivi spojevi.....	22

4.2.	Antimikrobno djelovanje	23
4.2.1.	Antibakterijsko djelovanje	23
4.2.2.	Antivirusno djelovanje	24
4.2.3.	Antiparazitno djelovanje	25
4.2.4.	Antigljivično djelovanje	25
4.3.	Antioksidacijsko djelovanje	26
4.4.	Antitumorsko djelovanje	26
4.5.	Ostala biološka djelovanja propolisa	26
5.	RASPRAVA.....	28
5.1.	Biološki značajne komponente propolisa	29
5.1.1.	Fenolni spojevi	29
5.1.2.	Isparljivi spojevi.....	30
5.2.	Kemotipovi propolisa	31
5.3.	Mehanizmi biološke aktivnosti propolisa.....	32
5.3.1.	Mehanizam antimikrobnog djelovanja	32
5.3.2.	Mehanizam antioksidacijskog djelovanja.....	33
5.3.3.	Mehanizam imunomodulacijskog i antitumorskog djelovanja	34
6.	ZAKLJUČCI	35
7.	POPIS CITIRANE LITERATURE.....	39
8.	SAŽETAK.....	47
9.	SUMMARY	49
10.	ŽIVOTOPIS.....	51

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Igoru Jerkoviću na strpljenju, stručnoj pomoći i savjetima pri izradi diplomskog rada..

Hvala svim prijateljima na nezaboravnim trenucima i što su mi studiranje učinili najljepšim razdobljem u životu.

Najveće hvala mojim roditeljima i obitelji na potpori i ohrabrenjima, brizi i ljubavi koju su mi pružali tijekom cijelog školovanja.

Zahvaljujem se Hrvatskoj zakladi za znanost koja je financirala ovaj rad projektom HRZZ-11-2013-8547 „Research of Natural Products and Flavours – Chemical fingerprinting and Unlocking the Potential“.

1. UVOD

1.1. Povijest propolisa

Riječ propolis potječe od grčke riječi „pro“-obrana i „polis“-grad, što označava obranu grada, odnosno obranu košnice. Propolis je pčelinji proizvod kojeg pčele koriste u košnici kako bi se zaštitile od vanjskih neprijatelja.¹ Zahvaljujući svojim biološkim djelovanjima, još od davnih vremena koristi se u narodnoj medicini. Podaci u literaturi pokazuju da se propolis koristi više od 2000 godina, još od 300 godina prije naše ere.²

Drevni Egipćani koristili su propolis za balzamiranje tijela mrtvaca, a Inke kao antipiretik. Grčki i rimski liječnici propolis su koristili ponajprije kao antiseptik za liječenje i cijeljenje rana, ali i za dezinfekciju usne šupljine.³ U razdoblju od 17. do 20. stoljeća propolis je u Europi bio jako popularan zahvaljujući svom antibakterijskom djelovanju te se čak spominje u Londonskoj farmakopeji. U 2. svjetskom ratu Rusi su ga koristili i kao pomoć u liječenju tuberkuloze, budući da su primijetili da olakšava plućne tegobe i poboljšava apetit. Na području Balkana, propolis je korišten za tretiranje rana i opekotina, upale grla te želučanih problema.⁴

Osim za liječenje propolis je korišten i u druge svrhe. Još u 17. stoljeću Stradivari i ostali violinisti koristili su propolis kao lak u izradi violina.⁵

Krajem 20. i početkom ovog stoljeća raste primjena propolisa u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, pa samim tim raste i zanimanje za ispitivanje njegovog kemijskog sastava i biološkog djelovanja.

1.2. Definicija propolisa

Prema Pravilniku o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda⁶, propolis jest pčelinji proizvod koji sadrži smolaste tvari koje pčele skupljaju s pupoljaka drvenastih biljaka.

Propolis koji se stavlja na tržište mora udovoljavati sljedećim uvjetima:

- mora sadržavati najmanje 35% tvari koje se ekstrahiraju alkoholom,
- ne smije sadržavati katran ni spojeve slične katranu odnosno katranske smole,

- ne smije sadržavati više od 5% mehaničkih nečistoća ni dijelova pčela, ne smije sadržavati više od 30% voska.

1.3. Sakupljanje i upotreba propolisa u košnici

Propolis je po svom podrijetlu izlučevina tkiva pupoljaka i/ili kore drveća, kojom se ono brani od štetnih mikroorganizama. Pčele ga sakupljaju te zatim koriste u košnici.⁷

Sakupljanje propolisa detaljno je opisao Meyer⁸ 1956. godine. Propolis sakuplja vrlo mali broj pčela radilica, uglavnom starijih od petnaest dana, koje su specijalizirane za tu djelatnost. Sakupljanje se obično odvija prije podne dok je propolis još mekan. Pčela otkine dio smole koju zatim prerađuje miješanjem s vlastitim pljuvačnim enzimima. Tako prerađenu smolu pčele miješaju s voskom te dalje koriste kao građivni i zaštitni materijal u košnici.

Propolis sakuplja uglavnom medonosna pčela tj. *Apis mellifica*. Tokom jednog leta pčela radilica prikupi približno 10 mg propolisa. Jedna pčelinja zajednica godišnje u prosjeku prikupi od 50 do 150 g propolisa.

Osim za zatvaranja u košnici i sprječavanje ulaska neprijatelja, propolis ima i antiseptičku ulogu u košnici. Pomoću svojih antibakterijskih, antigljivičnih i antivirusnih svojstava održava košnicu sterilnom te pomaže u borbi protiv infekcija. Uginule pčele i tijela uginulih štetočina oblažu se propolisom i tako se sprečava njihovo raspadanje, a samim tim eliminira izvor potencijalne infekcije u košnici.⁷

1.4. Botanički izvor propolisa

Postoji nekoliko tipova propolisa ovisno o biljkama prisutnima na određenom zemljopisnom području, dostupnosti biljaka tijekom sezone te vrsti pčela. To objašnjava zašto propolis nalazimo u različitim bojama, od žute, preko crvene i zelene, pa sve do smeđe boje. Pčele sakupljaju smolu u svom ekosustavu te o njemu ovisi sastav propolisa.¹

U umjerenoj klimatskoj zoni glavni izvor smole pčelama su različite vrste topole (*Poplar* spp.). To vrijedi za Europu, Sjevernu Ameriku, ne-tropska područja Azije te Novi

Zeland. U Rusiji, naročito sjevernijim područjima, pupoljci breze (*Betula pendula*) predstavljaju glavni izvor smole. U tropskoj zoni nema topola i breza, zato pčele moraju pronaći nove izvore. Tako su na području Tunisa glavni izvori smole vrste iz roda *Cistus* (*Cistus* spp.), a na području Venecuele, Amazone i Kube biljne vrste iz roda Kluzija (*Clusia* spp.), najviše *Clusia minor* te *Clusia major*.⁹

U Brazilu postoji više izvora propolisa ovisno o geografskoj lokaciji. Razlikujemo „Zeleni“ propolis, karakterističan za jug Brazila, koji potječe od vrsta roda *Baccharis*, uglavnom *B. dracunculifolia*, te „Crveni“ propolis, karakterističan za sjever Brazila, a potječe od vrsta roda *Dalbergia*.¹⁰

1.5. Fizikalna i organoleptička svojstva propolisa

Fizikalna i organoleptička svojstva propolisa ovise uglavnom od vrste biljaka koje se nalaze u radijusu letenja pčela. Propolis ima ugodan miris biljnih pupoljaka, meda, voska i vanilije, gorakast okus, ljepljiv je pri dodiru i ako se čuva duže, tamni. Pri gorenju luči ugodan miris smole.¹¹ Boja propolisa jako je promjenjiva. Kreće se od svjetlo žute, preko svih nijansi smeđe i crvene, do crne. (Slika 1.)



Slika 1. Primjeri različitih boja propolisa

Propolis je tvar promjenjive konzistencije ovisno o temperaturi. Na temperaturi od 25 °C do 45 °C propolis je meka i vrlo ljepljiva tvar. Na temperaturama manjim od 15 °C, te kada je zamrznut, ili blizu zamrzavanja, postaje tvrd i lomljiv. Ostaje lomljiv nakon tretmana zamrzavanjem čak i na višim temperaturama. Ljepljivost mu se povećava na temperaturama iznad 45 °C. Propolis je obično u tekućem stanju na temperaturama od 60 °C do 70 °C, ali za neke uzorke temperatura tališta može biti i 100 °C.¹²

Slabo se otapa u hladnoj vodi, bolje u vrućoj: od 7 do 10%. U eteru zagrijanom do 123 °C se otapa do 66%. U etilnom alkoholu se otapa od 50 do 75%, a u acetonu od 20 do 40%. Topljivost ovisi o trajanju ekstrakcije, temperaturi otapala te veličini čestica propolisa (najbolje je da bude u obliku praška). U smjesi otapala (eter i alkohol, kloroform i alkohol) postiže se bolja topljivost. Propolis je topljiv i u benzinu, masnoćama, ulju i vazelinu. Specifična težina propolisa je između 1.12 i 1.136.¹¹

Zagrijavanjem u vodenoj kupelji propolis se razdvaja na dva dijela: viskoznu masu koja pada na dno te vosak koji pluta na površini i ima mnoge koristi u pčelarstvu.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je proučiti dostupnu literaturu i znanstvene članke o fitokemijskim karakteristikama i biološkoj aktivnosti propolisa. Iz literaturnih podataka izdvojiti metode određivanja kemijskog sastava propolisa te metode određivanja antioksidacijske i antimikrobne aktivnosti. Kroz rezultate prikazati sastav propolisa te dokazanu biološku aktivnost propolisa. U raspravi usporediti dobivene rezultate i prikazati mehanizme biološke aktivnosti propolisa.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ekstrakcija propolisa

Propolis se ne može koristiti izravno kao sirovi materijal, a jednostavno frakcioniranje u svhu dobivanja zasebnih komponenti je vrlo teško zbog njegovog složenog sastava. Uobičajeni i najčešći način je ekstrahiranje frakcije topljive u etanolu (propolis balzam), pri čemu se uklanja vosak, a konačni rezultat je alkoholni ekstrakt propolisa koji je bogat biološki aktivnim komponentama.¹³ Osim etanolne ekstrakcije, postoji i vodena ekstrakcija koja je također pokazala pozitivne značajke propolisa.

Odabir otapala ovisi o konačnoj uporabi ekstrakta. Dok se za medicinsku upotrebu gotovo uvijek koristi vodeni i etanolni ekstrakt propolisa, za kozmetičke svrhe i vanjsku upotrebu najčešće se koristi propilenglikol.¹⁴

3.2. Kemijska analiza propolisa

3.2.1. Kromatografske tehnike

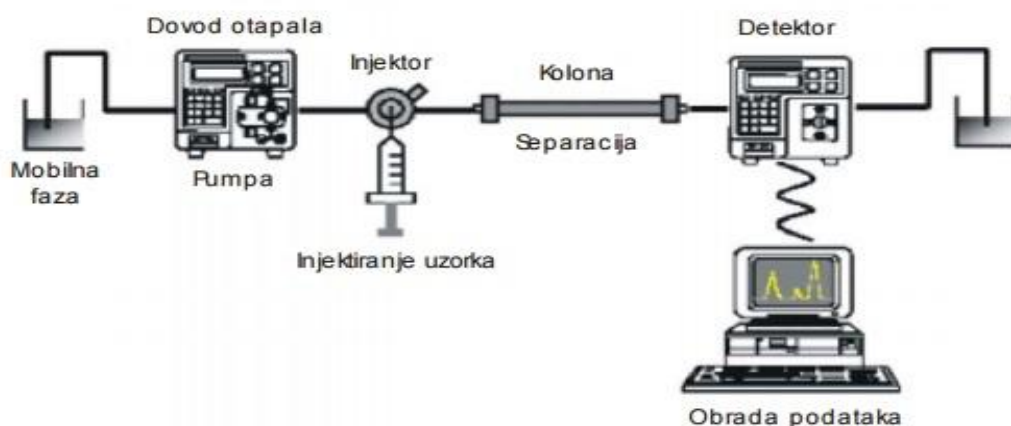
Potpuna kemijska karakterizacija propolisa zahtijeva korištenje različitih tehnika odvajanja, koje omogućuju identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih komponenti. Prema Europskoj Farmakopeji, kromatografske tehnike HPTLC i HPLC najpopularnije su metode za rutinsku analizu biljnih spojeva. Kromatografske tehnike se najčešće koriste za određivanje kemijskog profila propolisa.¹⁵

3.2.1.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*) danas je najrazvijeniji oblik kromatografije. Svaki kromatografski proces zahtijeva postojanje dvije faze, stacionarne i mobilne. Kod HPLC-a stacionarna se faza sastoji od finih čvrstih čestica malog promjera (3-50 μm) ravnomjerno raspodijeljenih unutar metalne, staklene ili plastične cijevi- kromatografske kolone. Mobilna faza je kapljevinna koja

služi kao otapalo za prenošenje otopljenog uzorka kroz kolonu. Do razdvajanja sastojaka neke smjese dolazi uslijed fizikalno-kemijskih interakcija sastojaka s mobilnom i stacionarnom fazom. Spojevi s malim afinitetom za stacionarnu fazu i dobre topljivosti u mobilnoj fazi brzo se ispiru iz kolone, a spojevi koji se dobro vežu za stacionarnu fazu i slabo su topljivi u mobilnoj kreću se mnogo sporije kroz kolonu. To dovodi do odjeljivanja sastojaka uzorka na koloni, koji se eluiraju sa kolone u različitim vremenima od trenutka injektiranja, a koji se na detektoru detektiraju kao kromatografski vršci, pikovi (engl. *peak*), iz čega se onda mogu odrediti kvantitativna i/ili kvalitativna svojstva detektirane tvari.¹⁶

Suvremeni se HPLC uređaj sastoji od automatskog uzorkivača (engl. *autosampler*), injektora, jedinice za pripravu mobilne faze umješavanjem dvaju ili više otapala, pumpe i otplinjača (degazera), kolone, detektora i sustava za prikupljanje podataka.¹⁶ Jedan takav uređaj shematski je prikazan na slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz HPLC-a

Vrsta detektora odabire se prema kemijskim svojstvima analita. Za analizu propolisa najviše se koriste "diode array" detektor (DAD) i maseni spektrometar (MS).¹⁷

3.2.1.2. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

Plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) tehnika je koja se intenzivno koristi za kemijsku analizu složenih smjesa kao što je propolis. GC-MS kombinira značajke

plinske kromatografije za odjeljivanje i kvantifikaciju smjesa, te masene spektrometrije za kvalitativnu analizu.¹⁷

GC-MS je pogodna tehnika za kvalitativnu i kvantitativnu analizu spojeva koje je moguće prevesti u plinovito stanje bez da se raspadnu pri temperaturama od nekoliko stotina Celzijevih stupnjeva. Temelji se na razdvajanju analita između plinovite mobilne faze i tekuće faze imobilizirane na inertnom nosaču stijenki kapilarne cjevčice (kapilarne kolone). Mobilna faza je plinovita i kemijski inertna (helij, dušik, vodik). Upareni uzorak injektira se kroz injektor na početku kolone i prolazi kroz nju nošen mobilnom fazom pod povišenim tlakom. Sastojci uzorka se zbog različitih fizikalno kemijskih svojstava razdvajaju na kromatografskoj koloni, te u različito vrijeme dolaze u MS.

U MS-u spojevi se ioniziraju pri čemu nastaju molekularni ioni i nabijeni fragmenti koji ulaze u magnetski analizator gdje im se pod djelovanjem jakog magnetskog polja može zakrenuti putanja ovisno o omjeru mase i naboja (m/z). Tako ionizirani spojevi dolaze na detektor gdje nastaje električni signal u obliku omjera m/z koji se zapisuje na pisaču.¹⁸

Karakteristični i konstantni produkti fragmentacije komponenti uzorka olakšavaju strukturnu identifikaciju pretraživanjem biblioteka referentnih spektara kao što su baze spektara NIST (engl. *National Institute of Standards and Technology*), EPA (engl. *Environmental Protection Agency*), Wiley i SWGDRUG (engl. *Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs*).¹⁹

3.2.1.3. Tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti

Zbog niza prednosti kao što su brzina, niska cijena i jednostavnost, tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Thin-Layer Chromatography*, HPTLC) zauzela je značajno mjesto u ispitivanju fenolnog profila propolisa u ovisnosti o njegovom botaničkom i geografskom porijeklu.²⁰

HPTLC je poboljšana forma tankoslojne kromatografije (TLC). Odjeljivanja TLC-om temelje se na adsorpciji, razdjeljenju (razdjeljenje normalnih faza i obrnutih faza), ionskoj izmjeni, isključenju veličinom ili kombinaciji ovih mehanizama. Nepokretna faza je tanki sloj fino dispergiranih čestica nanosen na staklenu ili plastičnu ploču, a pokretna se faza kreće

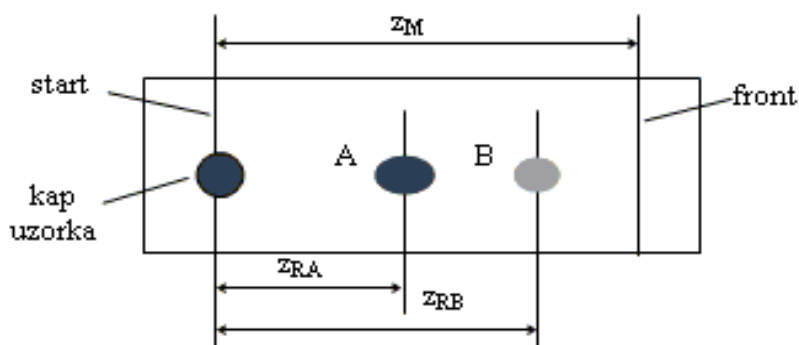
kapilarnim silama ili silom gravitacije uzduž sloja. Kao nepokretne faze dolaze u obzir anorganski adsorbensi, ionski izmjenjivači i molekularna sita, poliamidi, celuloza, aktivni ugljen, itd. Debljina tankog sloja kreće se od 0,2 do 2 mm. Uzorak se nanosi u obliku kapi na udaljenosti 1-2 cm od ruba ploče tj. iznad razine otapala (pokretne faze). Ploča se stavlja u zatvorenu komoru zasićenu parama otapala tj. pokretne faze te se otapalo diže silama kapilariteta. Kada je pokretna faza prešla oko 2/3 ploče razvijanje je završeno i ona se vadi iz komore.²¹

Kromatogram dobiven TLC-om je plošni kromatogram. Kao vrijednost zadržavanja u TLC koristi se faktor zaostajanja (R_F), a z_R i z_M predstavljaju put analita odnosno pokretne faze (eluensa).

$$R_F = z_R/z_M \quad z_R < z_M \quad R_F < 1$$

Kod simetričnih mrlja promatra se središte mrlje, a kod asimetričnih mjesto maksimalnog intenziteta mrlje (Slika 3.).

Modifikacijom tankog sloja na ploči dobivena je TLC visoke djelotvornosti (HPTLC) kojom se postižu brža i bolja odjeljivanja.



Slika 3. Shematski prikaz procjene mrlji u TLC

3.2.2. Spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrijske metode vrlo su korisne za brzo i jednostavno određivanje sadržaja fenolnih spojeva u propolisu kao i za rutinsku kontrolu pripravaka propolisa. Postoje

učinkovite, precizne i pouzdane spektrofotometrijske metode koje su usmjerene na određivanje flavonoida i ukupnih fenolnih spojeva kao glavnih i najvažnijih biološki aktivnih sastojaka propolisa.¹⁷ Naime, dokazano je da određivanje ukupnog sadržaja fenola i flavonoida bolje odražava biološku aktivnost propolisa nego kvantifikacija pojedinačnih komponenti.²²

Folin-Ciocalteu (FC) metoda najčešće je korištena metoda za spektrofotometrijsko određivanje **ukupnog sadržaja fenola** u propolisu. Temelji se na oksidaciji fenolnih grupa dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa i nastajanju obojenog produkta. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframske i fosfomolibdenske kiseline, a pri oksidaciji fenolnih grupa do kinona ove kiseline reduciraju se u okside volframa i molibdena koji su plavo obojeni. Mjeri se intenzitet nastalog obojenja pri 765 nm, uz galnu kiselinu (3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina) kao standard. Rezultat se izražava kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) na gram suhe tvari uzorka (mg GAE/g s.t.).²³



Spektrofotometrijski test temeljen na stvaranju kompleksa s aluminijevim (III) kloridom (AlCl_3) je metoda izbora za kvantitativno određivanje **sadržaja flavona i flavonola** u propolisu. Metoda se temelji na tome da AlCl_3 formira stabilne kisele komplekse s C-4 keto skupinom i C-3 ili C-5 hidroksilnom skupinom flavona i flavonola, a nestabilne komplekse s ortodihidroksilnim skupinama u A ili B prstenu flavonoida. Nedostatak ove metode može biti taj što u biljkama flavoni i flavonoli mogu postojati u obliku glikozida, a prisutnost šećerne skupine ugrožava ispravnu kelaciju s AlCl_3 . Bilo koja blokada hidroksilnih skupina glikozilacijom, čak i metoksilacijom, na pozicijama 3, 5, 3' ili 4' sprječava kelaciju s AlCl_3 .²⁴

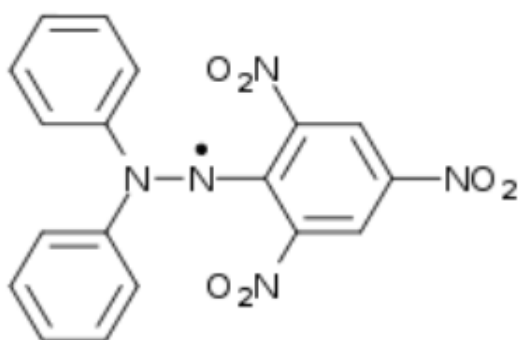
Flavanoni i flavanonoli ne doprinose spektrofotometrijskim mjerenjima temeljenima na reakciji s AlCl_3 . Navedeni spojevi se ponašaju kao ketoni u reakciji s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (2,4-DNPH) u kiselom mediju, pri čemu nastaje narančasto obojeni spoj fenilhidrazon s maksimumom apsorpcije na 495 nm. Kao standard koristi se naringenin.²⁵

Zbog dvostruke veze na poziciji C2, flavoni i flavonoli ne mogu reagirati s 2,4-DNPH što ih razlikuje od flavanona i flavanonola. **Ukupni sadržaj flavonoida** prikazan kao zbroj dviju navedenih spektrofotometrijskih metoda koristan je podatak za procjenu sadržaja flavonoida u proizvodima od propolisa.²⁶

3.3. Metode određivanja antioksidacijskog djelovanja propolisa

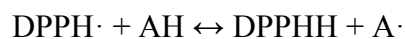
Antioksidans je molekula sposobna spriječiti oksidaciju drugih molekula i štiti stanice od štetnog djelovanja slobodnih radikala, kao što su reaktivni kisikovi spojevi. Različite *in vitro* metode korištene su za određivanje antioksidacijske aktivnosti propolisa kao što su FRAP, ABTS i DPPH metoda. DPPH metoda najčešće je korištena metoda određivanja antioksidacijskih svojstava propolisa jer je jednostavna, brza, jeftina i precizna.²⁷

Metoda DPPH (engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) je metoda „hvatanja“ slobodnih DPPH radikala. Metoda se zasniva na sposobnosti stabilnog slobodnog radikala 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil-radikala (DPPH·) da reagira s vodik donorom. DPPH je dušikov radikal koji na jednom atomu dušikovog mosta sadrži nespareni elektron.²⁸ (Slika 4.)



Slika 4. Struktura 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil-radikala (DPPH·)

Mehanizam reakcije zasniva se na donaciji atoma vodika DPPH· radikalumu od strane antioksidansa (AH). Tad nastaje DPPHH, a antioksidans postaje radikal (A·).



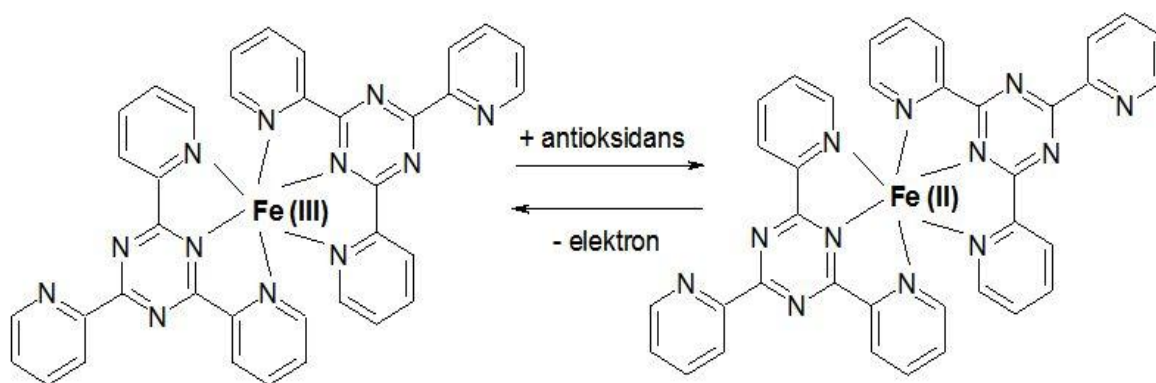
DPPH· intenzivno apsorbira u vidljivom dijelu spektra pri valnoj duljini od 517 nm. Kad prijeđe u DPPH oblik dolazi do smanjenja apsorpcije, a kao posljedica njegove redukcije s antioksidansom dolazi do promjene boje iz intenzivno ljubičaste u žutu. Reakcija se prati spektrofotometrijski pri 517 nm. Nakon 30 minuta mjerenja očita se apsorbancija te se računa postotak inhibicije radikala prema sljedećem izrazu:

$$\% \text{ inhibicije DPPH}\cdot = \frac{(A_{co} - A_{at})}{A_{co}} \cdot 100$$

A_{CO} = apsorbancija kontrole (otopina DPPH· radikala) kod $t = 0$ minuta

A_{at} = apsorbancija reakcijske smjese nakon $t = 30$ minuta.

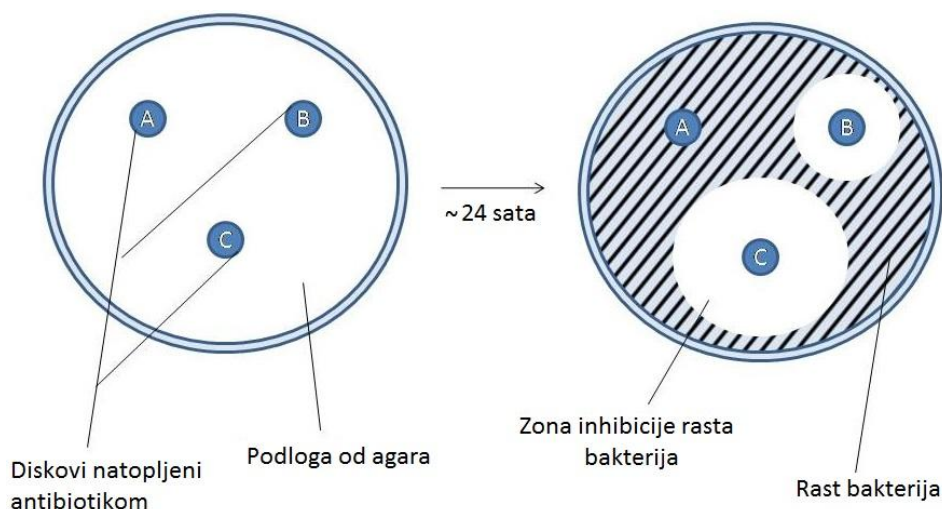
FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metoda jednostavna je i brza, indirektna metoda, koja se temelji na redukciji Fe^{3+} iona u Fe^{2+} ion u prisutnosti antioksidansa. Nastali Fe^{2+} ioni u prisutnosti 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ reagens) tvore plavo obojen kompleks, koji ima apsorpcijski maksimum pri 593 nm. Reakcija se odvija u kiselom mediju.²⁷



Slika 5. Reakcija redukcije željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ)

3.4. Metode određivanja antimikrobnog djelovanja propolisa

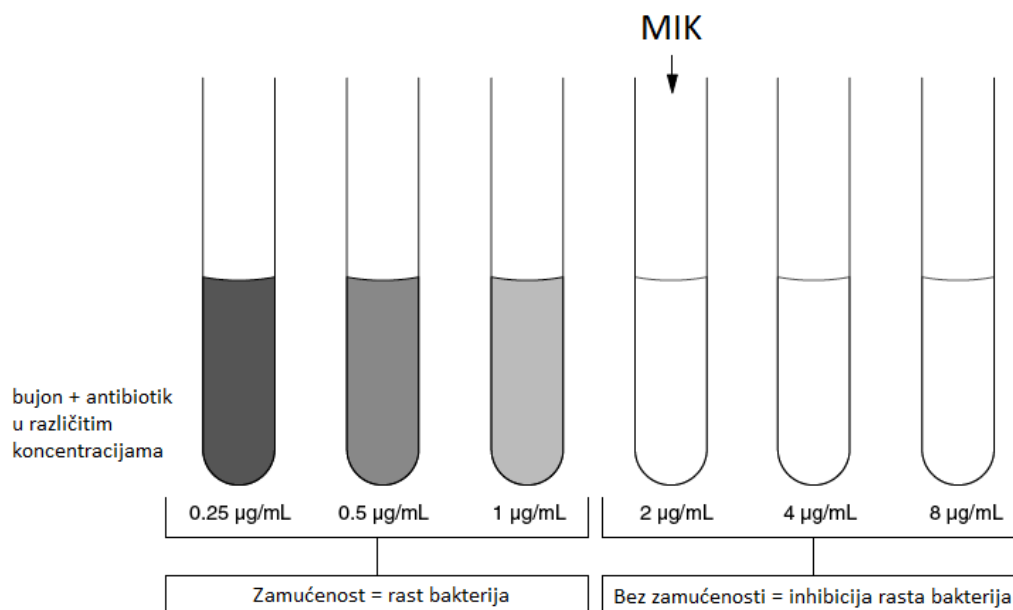
Osjetljivost bakterija na antibiotike može se testirati difuzijskim i dilucijskim metodama te njihovom kombinacijom (E-test). Najčešće korištena metoda određivanja antimikrobnog djelovanja jest **disk difuzijska metoda**. Metoda je kvalitativna, a određuje se osjetljivost bakterija na antibiotik. Difuzijski postupak provodi se u Petrijevoj zdjelici na krutoj hranjivoj podlozi (najčešće agar). Diskovi natopljeni antibiotikom stavljaju se na površinu hranidbene podloge koja je prethodno inokulirana čistom bakterijskom kulturom. Nakon inkubacije na optimalnoj temperaturi mjeri se promjer zone inhibicije rasta bakterija, te se prema standardu ispitivani soj svrstava u kategorije osjetljiv, umjereno osjetljiv i otporan.⁴



Slika 6. Disk difuzijska metoda

Metoda dilucije predstavlja kvantitativnu metodu određivanja antimikrobnog djelovanja. Služi za određivanje najniže (minimalne) koncentracije antimikrobne tvari koja sprječava rast bakterija (MIK). Antimikrobna tvar serijski se dvostruko razrjeđuje i fiksni volumen dodaje u tekuću (bujon) ili krutu (agar) podlogu. Nakon inokulacije bakterijske kulture slijedi period inkubacije na optimalnoj temperaturu. Minimalna inhibicijska koncentracije (MIK) predstavlja koncentraciju antimikrobne tvari u prvoj podlozi na kojoj nema vidljivog rasta bakterija, a izražava se najčešće u $\mu\text{g/mL}$ ili mg/L . Ako se nakon inkubacije podloge u bujonu, u kojima nije došlo do vidljivog rasta bakterija, presade na krutu podlogu bez antibiotika, dobije se minimalna baktericidna koncentracija (MBK). Minimalna

baktericidna koncentracija tj. najmanja koncentracija koja ubija bakterije očituje se na prvoj podlozi na kojoj nema vidljivog rasta bakterija.²⁹



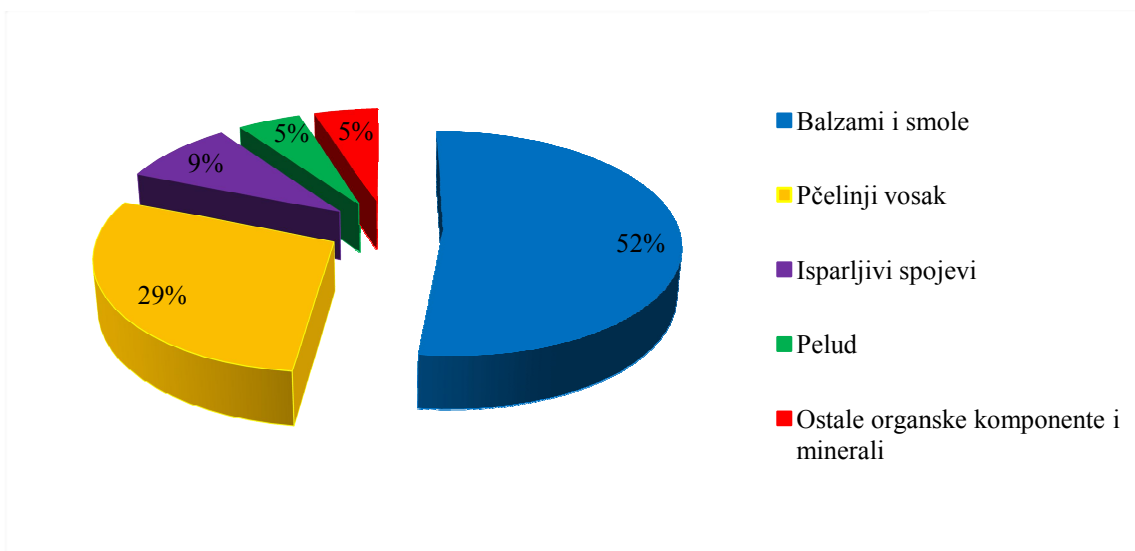
Slika 7. Primjer određivanja minimalne inhibicijske koncentracije (MIK) dilucijskom metodom

E-test je kombinirani test koji povezuje disk difuzijsku i dilucijsku metodu. Na hranidbenu podlogu prethodno inokuliranu bakterijskom kulturom postavlja se posebna traka koja je impregnirana antibiotikom u gradijentu koncentracije. Iz zone inhibicije rasta može se očitovati minimalna inhibicijska koncentracija (MIK).

4. REZULTATI

4.1. Kemijski sastav propolisa

Propolis je pčelinji proizvod kompleksnog sastava. Njegov sastav je varijabilan te ovisi ponajprije o mjestu i vremenu sakupljanja², ali općenito, sirovi propolis je sastavljen od oko 50% balzama i smola, 30% pčelinjeg voska, 10% isparljivih spojeva, 5% peludi i 5% različitih organskih komponenti i minerala.¹



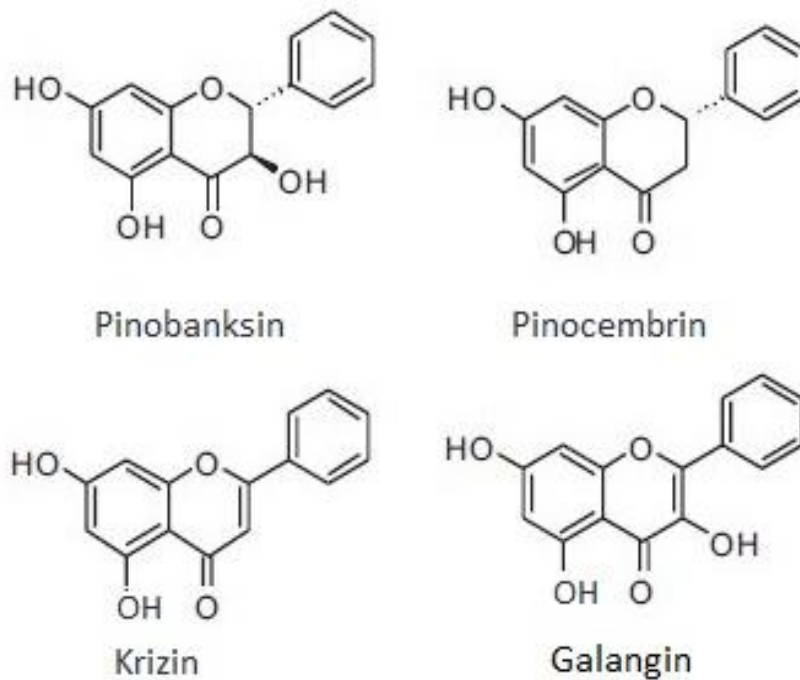
Slika 8. Prosječni kemijski sastav propolisa

Podrijetlo tvari u propolisu potječe iz triju izvora: biljnih izlučevina, sekrecijskih supstanci pčelinjeg metabolizma i tvari dodanih za vrijeme njegove obrade.¹³ Do sada je u propolisu identificirano više od 300 različitih komponenti.

4.1.1. Balzami i smole

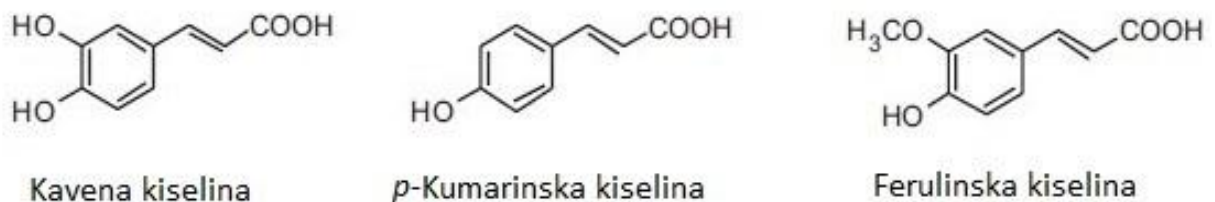
Balzami i smole, tj. polifenolna frakcija propolisa sastoje se od flavonoida i ostalih fenolnih spojeva (ne-flavonoida).

Flavonidi su biološki najvažnije komponente propolisa. Zastupljenost flavonoida u propolisu je različita, a ovisi o mnogo faktora. Najvažiji flavonoidi u propolisu su krizin, galangin, acacetin, pinocembrin, pinobanksin, apigenin, luteolin, kemferol i kvercetin.³⁰



Slika 9. Kemijske strukture nekih od najvažnijih flavonoida u propolisu.

Ne-flavonoidi u propolisu uključuju jednostavne fenole, fenolne kiseline, kumarine, ksantone, stilbene, lignine i lignane. Na temelju strukture, razlikuju se dvije skupine fenolnih kiselina: derivati benzojeve kiseline (hidroksibenzojeve kiseline, C6-C1) i derivati cimetne kiseline (hidroksicimetne kiseline, C6-C3).³¹ Neki od fenolnih spojeva karakterističnih za propolis su: CAPE (fenil ester kavene kiseline), kavena kiselina, cimetna kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, artepilin C i dr.



Slika 10. Kemijske strukture odabranih fenolnih kiselina prisutnih u propolisu

4.1.2. Pčelinji vosak

Analizom uzoraka Brazilskog propolisa pronađeni su ugljikovodici i esteri slični onima pronađenima u uzorcima Europskog propolisa. Također, sastav voska se pokazao identičan sastavu voska u košnici što sugerira da potječe od pčela, a ne od biljaka. Najzastupljeniji ugljikovodici su alkani i alkeni s 27, 29, 31 i 33 atoma ugljika.³²

Osim ugljikovodika, vosak iz propolisa sadrži estere, alkohole, masne kiseline te mnoge druge nepolarne spojeve. Od alkohola najzastupljeniji su primarni alkoholi s 24, 30 i 34 atoma ugljika. Organske kiseline koje su identificirane u većim količinama u pčelinjem vosku su arahidonska, oleinska, linolna, palmitinska, stearinska i cerotinska kiselina.³³

4.1.3. Ugljikohidrati

U uzorcima propolisa s Kanarskih otoka i Malte pronađen je značajan broj različitih ugljikohidrata i njihovih alkohola. Pomoću GC-MS metode identificirani su ugljikohidrati ksiloza, galaktoza, manoz, maltoza, laktoza, fruktoza i dr., kao i šećerni alkoholi npr. inozitol.

Još nije sasvim jasno odkuda potječu ugljikohidrati u propolisu. Smatra se da je biljna sluz koja je bogata ugljikohidratima glavni biljni izvor propolisa s Kanarskih otoka i Malte te ujedno izvor ugljikohidrata.^{34,35}

4.1.4. Vitamini i minerali

Dokazana je promjenjiva količina vitamina u propolisu. Pronađeno je sedam vitamina: vitamin B₁(tiamin), B₂(riboflavin), B₃(nikotinska kiselina), B₅(pantotenska kiselina), B₆(piridoksin), C i E.²

Analiza propolisa iz različitih hrvatskih regija pokazala je da propolis sadrži elemente u tragovima: kalcij (Ca), kalij (K), magnezij (Mg), natrij (Na), bor (B), barij (Ba), krom (Cr), željezo (Fe), mangan (Mn), nikal (Ni), stroncij (Sr) i cink (Zn), te toksične elemente: arsen (As), kadmij (Cd), živa (Hg) i olovo (Pb).³⁶

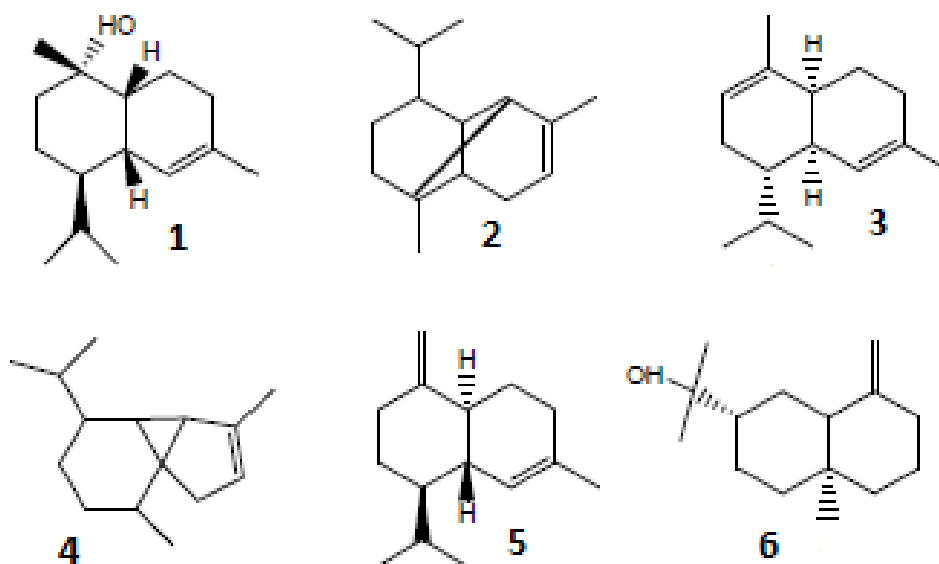
Analiza argentinskog propolisa pokazala je da sadrži: brom (Br), kobalt (Co), krom (Cr), željezo (Fe), rubidij (Rb), antimon (Sb), samarij (Sm) i cink (Zn).³⁷

4.1.5. Isparljivi spojevi

Iako isparljivi spojevi zauzimaju oko 10% ukupnog sastava, njihov aromatični miris i značajna biološka aktivnost čine ih bitnim sastavnicama propolisa.

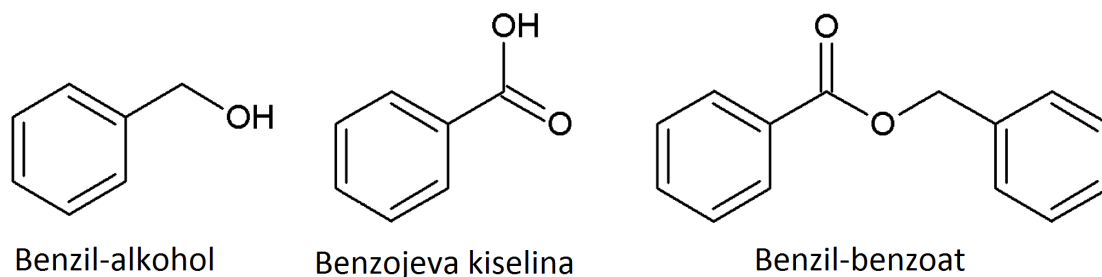
Terpeni predstavljaju najzastupljeniju skupinu među isparljivim spojevima te imaju bitnu ulogu u razlikovanju pravog od lažnog propolisa. Terpeni koje najviše nalazimo u propolisu dijele se na monoterpene i seskviterpene. Njihov sastav i količina su jako promjenjivi te ovise o mnogo faktora.¹⁰

Analizom propolisa s područja Hrvatske identificiran je značajan broj različitih terpena od kojih su najzastupljeniji oksidirani seskviterpeni: α -eudesmol, β -eudesmol i γ -eudesol. Također, pronađena je velika količina seskviterpenskkih ugljikovodika: γ -kadinen, α -muurolen, *cis*-kalamenen i dr.³⁸



Slika 11. Strukture odabranih seskviterpena pronađenih u propolisu: (1) δ -kadinol, (2) kopaen, (3) α -muurolen, (4) α -kubeben, (5) γ -kadinen i (6) β -eudesmol.

Od ne-terpenskih komponenti najzastupljeniji su benzil-alkohol, benzojeva kiselina i benzil-benzoat.³⁹



Slika 12. Kemijske strukture najzastupljenijih ne-terpenskih isparljivih spojeva u propolisu

4.2. Antimikrobno djelovanje

Antimikrobno djelovanje propolisa zabilježeno je kod različitih bakterija, virusa, gljivica te parazita. *In vitro*, propolis djeluje direktno na mikroorganizme sprječavajući njihov rast, dok u organizmu djeluje i na indirektan način tako što potiče stvaranje stanica imunološkog sustava te protutijela.⁴⁰

4.2.1. Antibakterijsko djelovanje

Učinak propolisa na bakterije smatra se najvažnijim biološkim svojstvom propolisa. Mnoge studije bavile su se istraživanjem učinka na različite G-pozitivne i G-negativne bakterije, aerobne i anaerobne, koristeći propolis različitog podrijetla i kemijskog sastava.³

Iako djelotvoran protiv većine bakterija, antibakterijsko djelovanje propolisa jače je ipak izraženo na G-pozitivne nego na G-negativne bakterije. Istraživanja su dokazala da propolis djeluje na: *Staphylococcus aureus*^{41,42}, *Streptococcus mutans*⁴³, *B. cereus* i *Bacillus subtilis*⁴⁴, *Pseudomonas* spp.⁴⁵, *Listeria monocytogenes*⁴⁶, *Salmonella enteritidis*⁴⁷, *Salmonella typhi*⁴⁸ i dr. (Tablica 1.)

Gram-pozitivne bakterije	Gram-negativne bakterije
<i>Aerobne:</i>	
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Brucella abortus</i>
<i>Enterococcus spp.</i> (<i>Enterococcus faecalis</i>)	<i>Corynebacterium sp.</i> (<i>C. pseudotuberculosis</i>)
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Nocardia asteroides</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Rhifococcus equi</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Staphylococcus spp.</i> (<i>S. auricularis, S. capitis, S. epidermidis, S. haemolyticus, S. hominis, S. mutans, S. warnerii</i>)	<i>Salmonella sp.</i> (<i>S. enteritidis, S. typhi, S. typhimurium</i>)
<i>Streptococcus spp.</i> (<i>S. cricetus, S. faecalis, S. pneumoniae, S. pyogenes, S. β-haemolyticus, S. mutans, S. sobrinus, S. viridians</i>)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Proteus vulgaris</i>
	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Anaerobne:</i>	
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>
<i>Peptostreptococcus micros</i>	<i>Porphyromonas anaerobius</i>
	<i>Prevotella intermedia</i>
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
	<i>Prevotella melaninogenica</i>
	<i>Prevotella oralis</i>
	<i>Veillonella parvula</i>

Tablica 1. Bakterije osjetljive na propolis

4.2.2. Antivirusno djelovanje

Za razliku od antibiotika, propolis djeluje i na viruse. Djelovanje propolisa na viruse potvrđeno je brojnim istraživanjima te se može pripisati flavonoidima. Istraživanja su pokazale da propolis i/ili njegovi sastojci djeluju na brojne viruse: polioviruse, korona, rotaviruse, adenoviruse i HSV (*Herpes simplex virus*).^{49,50,51,52}

Također, dokazano je da propolis i neki njegovi sastojci (apigenin, krizin) djeluju profilaktički na virus gripe, tako što blokiraju neuraminidazu te sprječavaju izlazak virusa iz inficirane stanice.^{53,54}

Klinička studija iz 2004. godine⁵⁵ dokazala je učinkovitost propolisa u liječenju genitalnog herpesa uzrokovanog HSV-2 (*Herpes simplex virus* tip 2). Masti na bazi propolisa pokazale su se učinkovitima u smanjenju trajanja genitalnih lezija, boli te povećanja intervala između epizoda bolesti.

4.2.3. Antiparazitno djelovanje

Prema određenim studijama, propolis se pokazao učinkovit kod većine parazita rasprostranjenih u tropskim i subtropskim područjima, kao što su: *Trichomonas vaginalis*⁵⁶ (uzročnik urogenitalne trihomonijaze), *Trypanosoma cruzi*⁵⁷ (uzročnik Chagasove bolesti ili američke tripanosomijaze), *Leishmania*⁵⁸ (uzročnik lišmanioze), *Gardia lamblia*⁵⁹ (uzročnik giardijaze, zarazne bolesti tankog crijeva).

Osim navedenog, propolis je pokazao inhibitorno djelovanje na *Toxoplasma gondi*⁶⁰, uzročnika toksoplazmoze. Navedena infekcija je jako opasna u trudnoći jer ne pokazuje specifične simptome kod trudnica, a kod djeteta uzrokuje razne abnormalnosti pa čak i spontani pobačaj. Propolis se također pokazao učinkovit kod *Trypanosoma brucei*, parazita koji uzrokuje bolest spavanja.^{61,62}

4.2.4. Antigljivično djelovanje

Iako je antibakterijski učinak propolisa važniji nego antigljivični, ipak mnoge studije dokazuju osjetljivost propolisa na različite klinički značajne gljivice.

In vitro istraživanja dokazala su pozitivno djelovanje propolisa iz različitih geografskih izvora na sojeve *Candida* spp. kao što su *C. albicans*^{50,63,64}, *C. genera*^{65,66}, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* i dr.^{67,68}

4.3. Antioksidacijsko djelovanje

U usporedbi s peludi i matičnom mliječi, ekstrakt propolisa pokazao je najjače antioksidacijsko djelovanje.⁶⁹

Istraživanja su pokazala da je antioksidacijski učinak proporcionalan koncentraciji polifenola.⁷⁰ Stoga, Europski propolis koji je bogatiji polifenolima, pokazuje jače antioksidacijsko djelovanje od Brazilskog propolisa.⁷¹ Također, vrijednost ORAC (engl. *Oxygen radical absorbance capacity*- kapacitet za apsorpciju kisikovih radikala) čistog propolisa veća je od njegovih ekstrakata. CAPE je spoj koji posjeduje snažnu antioksidacijsku moć.⁷²

4.4. Antitumorsko djelovanje

Brazilski zeleni propolis pokazao je značajnu aktivnost protiv različitih tumorskih stanica *in vitro*.^{73,74} Glavni mehanizam kojim propolis djeluje na tumorske stanice povezan je s inhibicijom njihovog rasta te poticanjem apoptoze.⁷⁵

In vivo, trodnevni tretman 10%-tnim brazilskim propolisom povećao je citotoksičnu aktivnost NK stanica protiv limfoma miša.⁷⁶

Europski propolis i neke izolirane polifenolne komponente (kavena kiselina, CAPE i kvercetin) mogu smanjiti broj tumorskih nodula u plućima, pri čemu je antimetastatski efekt propolisa veći nego onaj pojedinih komponenti.⁷⁷

4.5. Ostala biološka djelovanja propolisa

Klinička ispitivanja iz 2003. godine kod pacijenata s blagom do umjerenom astmom dokazala su da propolis smanjuje broj noćnih napadaja, širi dišne puteve i poboljšava ventilatornu funkciju pluća. Broj noćnih napadaja smanjio se s prosječno 2.5 na 1 tjedno kod one skupine koja je uz stalnu terapiju teofilinom primala vodeni ekstrakt propolisa. Također, došlo je do povećanja forsiranog vitalnog kapaciteta (FVC), forsiranog ekspiratornog

volumena u prvoj sekundi (FEV1), vršnog ekspiratornog protoka (PEFR) i forsiranog ekspiratornog protoka tijekom 25-75% FVC-a (FEF25-75).⁷⁸

Prilikom korištenja kod alergija i rinitisa, nije primijećen učinak nakon jedne doze, ali značajno smanjenje curenja nosa i kihanja primijećeno je kada se doza od 1000 mg/kg koristila kroz dva tjedna. Ispitivanja su se provodila na miševima.⁷⁹

Dokazana su i mnoga druga biološka djelovanja, kao što su: zacjeljujuće, protuupalno, hepatoprotektivno, antiulcerozno, antihipertenzivno, anestetsko, hipoglikemijsko i dr.³

5. RASPRAVA

5.1. Biološki značajne komponente propolisa

5.1.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti prisutni u velikom broju biljnih vrsta u značajnim količinama. Premda se radi o vrlo heterogenoj skupini spojeva, gledano s kemijskog stajališta osnovno obilježje svih fenolnih spojeva je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova. Sinteza biljnih fenola može se odvijati na nekoliko načina. Dva najvažnija puta biosinteze uključuju put šikiminske kiseline i put jabučne kiseline (acetil-malatni put). Kroz put šikiminske kiseline sintetizira se većina biljnih fenola.⁸⁰

Fenolni spojevi u prirodi se nalaze uglavnom u obliku glikozida, tj. povezani su s različitim molekulama ugljikohidrata. Pčele modificiraju propolis pomoću glukozidaze, enzima pljuvačnih žlijezda, za vrijeme sakupljanja i obrade. Rezultat enzimske modifikacije je hidroliza fenolnih spojeva na slobodne spojeve te povećanje njihove farmakološke aktivnosti.⁸¹

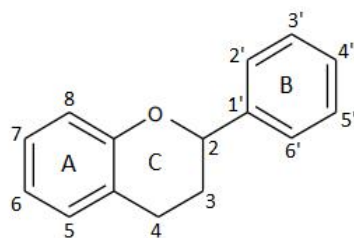
Fenolne spojeve u propolisu dijelimo na flavonoide i ostale fenolne spojeve.

Flavonoidi predstavljaju veliku skupinu sekundarnih metabolita koji su prisutni u svim biljkama, a odgovorni su za obojenost cvjetova i listova te jako važni za normalan rast, razvoj i obranu biljaka. Flavonoidi se danas sve češće spominju kao pomoć pri liječenju raznih vrsta bolesti jer posjeduju antibakterijsko, antiviralno, protuupalno i antioksidacijsko djelovanje. Osnovna kemijska struktura flavonoida je skelet od petnaest ugljikovih atoma raspoređenih u dva aromatska prstena (A i B prsten) povezana heterocikličkim piranskim prstenom (C prsten).¹⁰ Neke općenite strukture flavonoida prikazane su na slici 13.

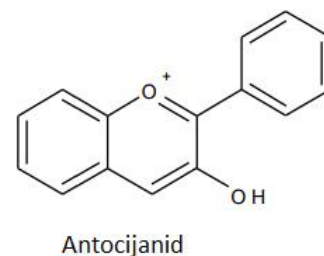
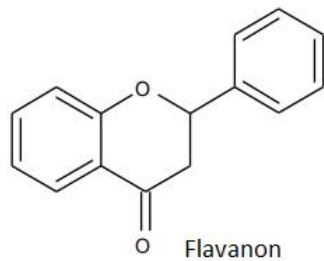
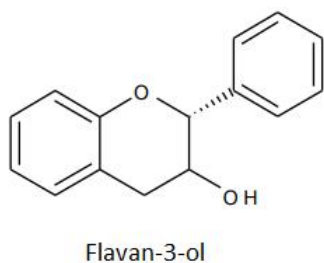
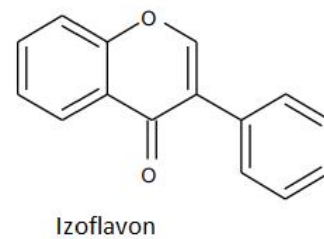
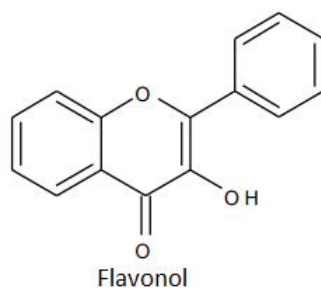
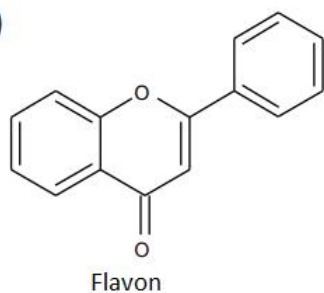
Prema kemijskoj strukturi, flavonoide u propolisu dijelimo u nekoliko skupina: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, kalkoni, dihidrokalkoni, izoflavoni, izodihidroflavoni, flavani, izoflavani i neoflavonoidi.¹⁰

Oko 90% flavonoida biljaka nalazi se u obliku glikozida. Glikozilacija kod flavonoida događa se najčešće u položaju 3, a manje u položaju 7. Šećer koji se najčešće javlja jest glukoza, no javljaju se i galaktoza, ramnoza i ksiloza.⁸²

(A)



(B)



Slika 13. Osnovna kemijska struktura flavonoida (A) i opće strukture najvažnijih podklasa flavonoida (B)

Jedna od glavnih karakteristika fenolnih spojeva i flavonoida je visoki antioksidacijski potencijal zbog kojeg im se pripisuje sposobnost prevencije različitih bolesti kao što su različite vrste tumora, osteoporoza, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti.⁸³

5.1.2. Isparljivi spojevi

Osim aromatičnog mirisa, isparljivi spojevi iz propolisa posjeduju antioksidacijska, antimikrobna te druga biološka svojstva.

Monoterpeni izolirani iz propolisa uključuju monocikličke, dicikličke monoterpene i njihove derivate. Seskviterpeni su najzastupljenija skupina spojeva u propolisu. Prema broju prstenova dijelimo ih na acikličke, monocikličke, dicikličke i tetracikličke.¹⁰

Brojna istraživanja potvrdila su biološku važnost isparljivih spojeva iz propolisa. Dokazano je njihovo djelovanje na G-pozitivne i G-negativne bakterije. Također, isparljivi spojevi povećavaju litičku aktivnost NK stanica te djeluju imunostimulirajuće.¹⁷

Za izolaciju isparljivih spojeva koriste se različite metode ekstrakcije, i to destilacija vodenom parom, Likens-Nickerson (simultana destilacija-ekstrakcija), ultrazvučna ekstrakcija otapalima, SPME (mikroekstrakcija na krutoj fazi) i dr. Najčešće korištena je Likens-Nickerson metoda ekstrakcije. Za daljnju analizu spojeva može se koristiti plinska kromatografija (GC) kao zasebna tehnika ili spregnuta sa spektrometrijom masa (GC-MS).¹⁷

5.2. Kemotipovi propolisa

Kemotip propolisa	Geografska lokacija	Biljni izvor	Glavne aktivne tvari
Tip topole	Europa, Sj. Amerika, ne-tropske regije Azije, Novi Zeland	Vrste roda <i>Populus</i> , najčešće <i>P. nigra</i> L.	Flavoni, flavanoni, cimetna kiselina i njeni esteri
Tip alekrima (zeleni propolis)	Brazil	<i>Baccharis</i> spp., najčešće <i>B. dracunculifolia</i> DC.	Prenilirane <i>p</i> -kumarinske kiseline, diterpenske kiseline
Tip breze	Rusija	<i>Betula pendula</i>	Flavoni i flavanoni (različiti od tipa topole)
Crveni propolis	Kuba, Meksiko, Brazil	Vrste roda <i>Dalbergia</i>	Izoflavonoidi (izoflavoni, pterokarpani)
Mediteranski propolis	Sicilija, Grčka, Kreta, Malta	Cupressaceae	Diterpeni
Tip kluzije	Kuba, Venecuela	Vrste roda <i>Clusia</i>	Poliprenilirani benzofenoni
Pacifički propolis	Pacifička regija (Tajvan, Indonezija)	<i>Macaranga tanarius</i>	C-prenilirani flavanoni

Tablica 2. Geografska lokacija, biljni izvor i glavne tvari najčešćih kemotipova propolisa.

Iako biljnog podrijetla, propolis je pčelinji proizvod i na različitim geografskim lokacijama pčele ga sakupljaju s različitih izvora. Zbog toga je sastav propolisa promjenjiv i ovisi o prisutnim biljnim vrstama na određenom području. S obzirom na to razlikujemo nekoliko kemotipova propolisa koji su okarakterizirani različitim aktivnim tvarima.⁴⁰ (Tablica 2.)

Propolis iz hrvatske pripada tzv. Europskom propolisu tj. propolisu tipa topole.

5.3. Mehanizmi biološke aktivnosti propolisa

5.3.1. Mehanizam antimikrobnog djelovanja

Mehanizam antimikrobnog djelovanja propolisa vrlo je složen, a može se pripisati sinergističkom djelovanju fenolnih spojeva i drugih tvari prisutnih u propolisu te raznim mehanizmima djelovanja.⁴¹ Do sada nije zabilježena rezistencija bakterija na propolis, a njen razvoj se smatra malo vjerojatnim jer je riječ o multikomponentnoj mješavini složenog mehanizma djelovanja.

Utvrđeno je da propolis utječe na citoplazmatsku membranu te na taj način inhibira pokretljivost bakterija, aktivnost enzima, diobu stanica i sintezu proteina.^{84,85} Također, propolis inhibira RNA-polimerazu što može djelomično objasniti sinergističko djelovanje propolisa s antibioticima koji djeluju na sintezu proteina.⁸⁴

Kod virusa, propolis djelomično blokira njihov ulazak u stanicu, djeluje na korake replikacije u stanici, ili dovodi do degradacije RNA prije ulaska virusa u stanicu ili nakon oslobađanja iz stanice.⁸⁶

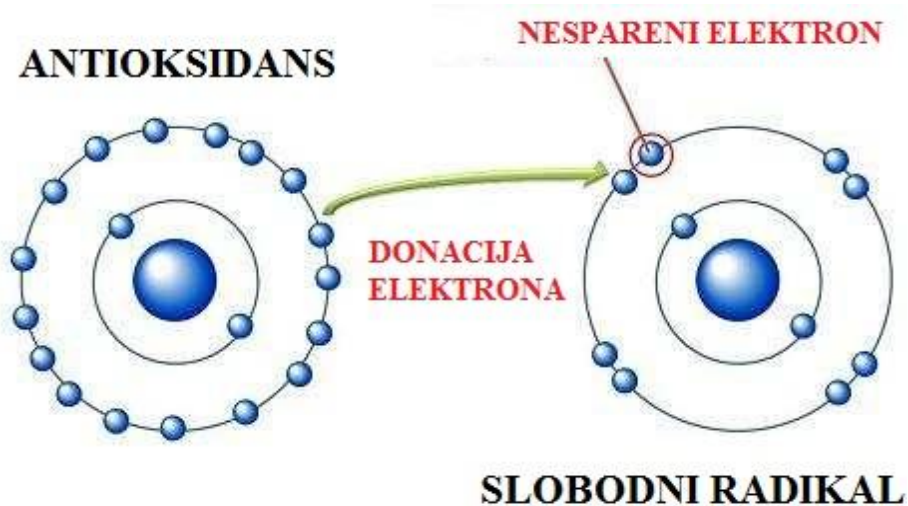
In vitro, propolis djeluje direktno na mikroorganizam, dok u *in vivo* uvjetima djeluje putem stimulacije imunološkog sustava aktivacijom mehanizama koji ubijaju mikroorganizam.⁴⁰ Zbog navedenog, *in vitro* postupci su korisni za pripremu istraživanja mogućeg potencijala prirodnog proizvoda, te ukoliko oni pokažu pozitivan rezultat, daljnji se postupci usmjeravaju na *in vivo* istraživanja koja bi trebala postići klinički značajne rezultate.⁸⁷

5.3.2. Mehanizam antioksidacijskog djelovanja

Antioksidansi su tvari koje štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala. Slobodni radikali su kemijski spojevi velike reaktivnosti uslijed prisutnosti nesparenih elektrona u vanjskoj elektronskoj ljusci. Nastaju svakodnevno u organizmu kao proizvodi razlaganja kisika u procesu oksidacije hrane u stanicama, odnosno stvaranja energije neophodne za život. Vežu se s tvarima sa kojima dolaze u kontakt u kemijskoj reakciji, poznatoj pod nazivom oksidacija. Vezivanjem slobodnih radikala na lipide, ugljikohidrate, bjelančevine i genetski materijal nastaju nove lančane reakcije i oštećenja. Nagomilavanje slobodnih radikala narušava zdravlje i ubrzava starenje, pa postajemo podložni nizu degenerativnih promjena.⁸⁸

Glavni je mehanizam djelovanja antioksidansa stupanje u reakciju sa slobodnim radikalima, oslabljujući ih i deaktivirajući. (Slika 14.)

Antioksidansi usporavaju starenje, snižavaju razinu kolesterola, smanjuju rizik nastanka raka, pomažu suzbijanju razvoja tumora, štite srce i krvne žile, pomažu kod kroničnih plućnih bolesti itd.



Slika 14. Mehanizam djelovanja antioksidansa

5.3.3. Mehanizam imunomodulacijskog i antitumorskog djelovanja

Antimikrobno djelovanje propolisa može se iskazati na dva načina– direktnim učinkom na mikroorganizme i indirektno putem stimulacije imunološkog sustava. *In vivo* i *in vitro* ispitivanja pokazala su da propolis može aktivirati makrofage, povećavajući njihovu mikrobicidnu aktivnost. Propolis također povećava litičku aktivnost NK („natural killer“) stanica prema stanicama tumora. Stimulira povećanu proizvodnju antitijela što ukazuje na mogućnost korištenja kao dodatka u cjepivima. Inhibitorni učinak na limfoproliferaciju može biti povezan s protuupalnim učincima. Optimalni rezultati prilikom davanja propolisa laboratorijskim životinjama su opaženi kad se propolis koristio u kraćem vremenskom razdoblju, ali potrebna su daljnja istraživanja da bi se utvrdila optimalna doza i vrijeme uzimanja za ljude. Propolis pokazuje antitumorski i antikancerogeni učinak te ima veliki antimutageni potencijal, iako su mehanizmi kemoprevencije koju pokazuje propolis još nepoznati.⁷⁵

6. ZAKLJUČCI

Propolis je pčelinji proizvod kojeg pčele koriste u košnici kako bi se zaštitile od vanjskih neprijatelja. Zahvaljujući svojim biološkim djelovanjima, još od davnih vremena koristi se u narodnoj medicini. Podaci u literaturi pokazuju da se propolis koristi više od 2000 godina, još od 300 godina prije naše ere. Koristili su ga drevni Egipćani, Inke, grčki i rimski liječnici i dr.

Prema Pravilniku o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda, propolis jest pčelinji proizvod koji sadrži smolaste tvari koje pčele skupljaju s pupoljaka drvenastih biljaka.

Propolis je po svom podrijetlu izlučevina tkiva pupoljaka i/ili kore drveća, kojom se ono brani od štetnih mikroorganizama. Pčele ga sakupljaju i koriste u košnici. Osim za zatvaranja u košnici i sprječavanje ulaska neprijatelja, propolis ima i antiseptičku ulogu. Pomoću svojih antimikrobnih, antigljivičnih i antivirusnih svojstava održava košnicu sterilnom te pomaže u borbi protiv infekcija.

Fizikalna i organoleptička svojstva propolisa ovise uglavnom od vrste biljaka koje se nalaze u radijusu letenja pčela. Ima ugodan miris biljnih pupoljaka, meda, voska i vanilije, gorakast okus, ljepljiv je pri dodiru i ako se čuva duže, tamni. Pri gorenju luči ugodan miris smole. Boja propolisa jako je promjenjiva a kreće se od svjetlo žute, preko svih nijansi smeđe i crvene, do crne.

Propolis je tvar promjenjive konzistencije ovisno o temperaturi. Na temperaturi od 25 °C do 45 °C je mekan i ljepljiv. Na temperaturama manjim od 15 °C, te kada je zamrznut, ili blizu zamrzavanja, postaje tvrd i lomljiv.

Slabo se otapa u hladnoj vodi, bolje u vrućoj. U eteru zagrijanom do 123 °C se otapa do 66%. U etilnom alkoholu se otapa od 50 do 75%, a u acetonu od 20 do 40%. Topljivost ovisi o trajanju ekstrakcije, temperaturi otapala te veličini čestica propolisa. U smjesi otapala (eter i alkohol, kloroform i alkohol) postiže se bolja topljivost. Propolis je topljiv i u benzinu, masnoćama, ulju i vazelinu.

Propolis se ne može koristiti izravno kao sirovi materijal, a jednostavno frakcioniranje u svhu dobivanja zasebnih komponenti je vrlo teško zbog njegovog složenog sastava. Uobičajeni i najčešći način je ekstrahiranje frakcije topljive u etanolu. Osim etanolne ekstrakcije, postoji i vodena ekstrakcija propolisa.

Potpuna kemijska karakterizacija propolisa zahtjeva korištenje različitih tehnika odvajanja, koje omogućuju identifikaciju i kvantifikaciju pojedinačnih komponenti. Prema Europskoj Farmakopeji, kromatografske tehnike HPTLC, HPLC i GC-MS najpopularnije su metode za određivanje kemijskog profila propolisa.

Osim kromatografskih, koriste se i spektrofotometrijske metode koje su usmjerene na određivanje sadržaja flavonoida i ukupnih fenolnih spojeva, kao glavnih i najvažnijih biološki aktivnih sastojaka propolisa. Dokazano je da određivanje ukupnog sadržaja fenola i flavonoida bolje odražava biološku aktivnost propolisa nego kvantifikacija pojedinačnih komponenti.

U istraživanjima antioksidacijske aktivnosti propolisa, najčešće korištene metode su DPPH- metoda, FRAP- metoda i ABTS- metoda.

U istraživanjima antimikrobne aktivnosti propolisa, najčešće se koriste disk difuzijska metoda, metoda dilucije te njihova kombinacija- E-test.

Propolis je pčelinji proizvod kompleksnog sastava. Njegov sastav je varijabilan te ovisi ponajprije o mjestu i vremenu sakupljanja, ali općenito, sirovi propolis je sastavljen od oko 50% balzama i smola, 30% pčelinjeg voska, 10% isparljivih spojeva, 5% peludi i 5% različitih organskih komponenti i minerala.

Vitamini pronađeni u propolisu su: B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, C i E. Minerali pronađeni u propolisu su Ca, K, Mg, Na, B, Ba, Cr, Fe, Mn, Sr, Zn, As, Cd, Hg, Pb, Br, Co, Rb, Sb, Sm.

Pčelinji vosak najčešće sadrži alkane i alkene s 27, 29, 31 i 33 atoma ugljika, estere, alkohole, masne kiseline te mnoge druge nepolarne spojeve. Od alkohola najzastupljeniji su primarni alkoholi s 24, 30 i 34 atoma ugljika. Organske kiseline koje su identificirane u većim količinama u pčelinjem vosku su arahidonska, oleinska, linolna, palmitinska, stearinska i cerotinska kiselina.

Fenolne spojeve u propolisu dijelimo na flavonoide i ostale fenolne komponente. Flavonidi su biološki najvažnije komponente propolisa. Najvažiji flavonoidi u propolisu su krizin, galangin, acacetin, pinocembrin, pinobanksin, apigenin, luteolin, kemferol i kvercetin.

Ne-flavonoidi u propolisu uključuju jednostavne fenole, fenolne kiseline, kumarine, ksantone, stilbene, lignine i lignane. Fenolni spojevi karakteristični za propolis su: CAPE, kavena kiselina, cimetna kiselina, *p*-kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, artepilin C i dr.

Jedna od glavnih karakteristika fenolnih spojeva i flavonoida je visoki antimikrobni i antioksidacijski potencijal zbog kojeg im se pripisuje sposobnost prevencije različitih bolesti. Dokazano je da je antioksidacijski učinak proporcionalan koncentraciji polifenola.

Iako isparljivi spojevi zauzimaju oko 10% ukupnog sastava, njihov aromatični miris i značajna biološka aktivnost čine ih bitnim sastavnicama propolisa. Isparljivi spojevi iz propolisa posjeduju antioksidacijska, antimikrobna te druga biološka svojstva. Terpeni predstavljaju najzastupljeniju skupinu među isparljivim spojevima. Terpeni koje najviše nalazimo u propolisu dijelimo na monoterpene i seskviterpene. Od ne-terpenskih komponenti najzastupljeniji su benzil-alkohol, benzojeva kiselina i benzil-benzoat.

Dokazana su mnoga biološka djelovanja propolisa, kao što su: antibakterijsko, antivirusno, antigljivično, antiparazitno, antioksidacijsko, imunostimulirajuće, antitumorsko, zacjeljujuće, protuupalno, hepatoprotektivno, antiulcerozno, antihipertenzivno, anestetsko, hipoglikemijsko i dr.

Mehanizam antimikrobnog djelovanja propolisa vrlo je složen, a može se pripisati sinergističkom djelovanju fenolnih spojeva i drugih tvari prisutnih u propolisu. *In vitro*, propolis djeluje direktno na mikroorganizam, dok u *in vivo* uvjetima djeluje putem stimulacije imunološkog sustava aktivacijom mehanizama koji ubijaju mikroorganizam.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol.* 1998; 36(4):347–363.
2. Ghisalberti EL. Propolis: a review. *Bee World.* 1979; 60:59-84.
3. Fokt H, Pereira A, Ferreira AM, Cunha A, Aguiar C. How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.* 2010; 2:481-493.
4. Wagh VD. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv Pharmacol Sci.* 2013; 2013:308249.
5. Monti M, Berti E, Carminati G, Cusini M. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis.* 1983; 9(2):163.
6. Ministarstvo poljoprivrede i šumarstva. Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda. *Narodne novine.* 2000.
7. Simone-Finstrom M, Spivak M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie.* 2010; 41(3):295-311.
8. Meyer W. 'Propolis bee' and their activities. *Bee world.* 1956; 37(2):25-36.
9. Bankova V, De Castro S, Marcucci M. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie.* 2000; 31(1):3-15.
10. Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ, Hu FL. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules.* 2014; 19(12):19610-19632.
11. Mujić I, Alibabić V, Travljanin D. Prerada meda i drugih pčelinjih proizvoda. *Studiograf Rijeka.* 2014.
12. Krell R. Propolis. Value-added products from beekeeping. *FAO Agricultural Services Bulletin no. 124.* 1996.
13. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie.* 1995; 26(2):83-99.
14. Sforcin JM. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytother Res.* 2016; 30(6):894-905.
15. Medić-Šarić M, Bojić M, Rastija V, Cvek J. Polyphenolic Profiling of Croatian Propolis and Wine. *Food Technol Biotech.* 2013; 51(2):159–170.
16. Nesek B. Razvoj matematičkog modela procesa gel-filtracije u kromatografskoj koloni. *Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije. Sveučilište u Zagrebu;* 2004.

17. Bankova V, Bertelli D, Borba R, Conti BJ, da Silva Cunha IB, Danert C, i dr. Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*. 2016; 1-49.
18. Veršić-Bratinčević M. Sredstva ovisnosti u biološkim uzorcima: određivanje i stabilnost, doktorska disertacija. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu; 2015.
19. Kaluzna-Czaplinska J. Current medical research with the application of coupled techniques with mass spectrometry. *Med Sci Monit*. 2011; 17(5):117-123.
20. Ristivojević PM. Određivanje hemijskog sastava, antioksidativnih i antimikrobnih svojstava propolisa topola tipa iz različitih regiona Srbije, doktorska disertacija. Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2014.
21. Luterotti S. Tankoslojna kromatografija. Dostupno na: http://free-zg.t-com.hr/Svjatlana_Luterotti/09/091/09132.htm, 28. rujna 2017.
22. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol*. 2005; 100(1-2):114-117.
23. Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Vitic*. 1977; 28:49-55.
24. Chang CC, Ming MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal*. 2002; 10:178– 182.
25. Nagy M, Grancai D. Colorimetric determination of flavanones in propolis. *Pharmazie*. 1996; 51:100-101.
26. Kosalec I, Pepeljnjak S, Bakmaz M, Vladimir-Knezević S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharm*. 2005; 55(4):423-430.
27. Robles-Zepeda RE, Hernandez-Martinez J, Garibay-Escobar A, Valencia-Rivera DE, Velazquez-Contreras CA. Botanical Origin and Biological Activity of Propolis. U: Rastrelli L. *Medicinal Plants. Biodiversity and Drugs*. Science Publishers; 2012.
28. Zorić I. Utjecaj različitih metoda ekstrakcije na sastav bioaktivnih spojeva propolisa, diplomski rad. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu; 2015.
29. Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC. *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. Boca Raton, FL: CRC Pres; 2007.

30. Farooqui T, Farooqui AA. Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012; 4:779-793.
31. Veitch NC, Grayer RJ. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Nat Prod Rep*. 2008; 25(3):555-611.
32. Negri G, Marcucci MC, Salatino A, Salatino MLF. Comb and propolis waxes from Brazil. *J Braz Chem Soc*. 2000; 11(5):453-457.
33. Negri G, Marcucci MC, Salatino A, Salatino MLF. Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes. *Adipologie*. 1998; 29(4):305- 314.
34. Bankova V, Christov R, Delgado Tejera A. Lignans and other constituents of propolis from Canary Islands. *Phytochemistry*. 1998; 49:1411-1415.
35. Popova M, Trusheva B, Antonova D, Cutajar S, Mifsud D, Farrugia C, Tsvetkova I, Najdenski H, Bankova M. The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chem*. 2011; 126:1431-1435.
36. Cvek J, Medić-Šarić M, Vitali D, Vedrinar-Dragojević I, Šmit Z, Tomić S. The content of essential and toxic elements in Croatian propolis samples and their tinctures. *Journal of Apicultural Research*. 2008; 47(1):35-45.
37. Cantarelli MA, Caminia JM, Pettenati EM, Marchevsky EJ, Pellerano RG. Trace mineral content of Argentinean raw propolis by neutron activation analysis (NAA): Assessment of geographical provenance by chemometrics. *LWT-Food Science and Technology*. 2011; 44(1):256-260.
38. Jerković I, Marijanović Z, Kuš PM, Tuberoso CI. Comprehensive Study of Mediterranean (Croatian) Propolis Peculiarity: Headspace, Volatiles, Anti-Varroa Treatment Residue, Phenolics, and Antioxidant Properties. *Chem Biodivers*. 2016; 13(2):210-218.
39. Bankova V, Popova M, Trusheva B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chem Cent J*. 2014; 8:28.
40. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol*. 2011; 133(2):253-260.
41. Krol W, Scheller S, Shani J, Pietsz G, Zcuba Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittelforschung*. 1993; 43(5), 607-609.
42. Lu LC, Chen YW, Chou CC. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol*. 2005; 102(2):213-220.

43. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(5):1302-1309.
44. Pavilonis A, Baranauskas A, Puidokaite L, Mazeliene Z, Savickas A, Radziūnas R. Antimicrobial activity of soft and purified propolis extracts. *Medicina.* 2008; 44(12):977-83.
45. Onlen Y, Tamer C, Oksuz H, Duran N, Altug ME, Yakan S. Comparative trial of different anti-bacterial combinations with propolis and ciprofloxacin on *Pseudomonas keratitis* in rabbits. *Microbiol Res.* 2007; 162(1):62-68.
46. Yang HY, Chang CM, Chen YW, Chou CC. Inhibitory effect of propolis extract on the growth of *Listeria monocytogenes* and the mutagenicity of 4-nitroquinoline-N-oxide. *J Sci Food Agric.* 2006; 86:937–943.
47. Uzel A, Sorkun K, Onçağ O, Cogulu D, Gençay O, Salih B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res.* 2005; 160(2):189-195.
48. Orsi RO, Sforcin JM, Funari SRC, Fernandes A Jr, Bankova V. Synergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella Typhi*. *Braz J Microbiol.* 2006; 37(2):108-112.
49. Gekker G, Hu S, Spivak M, Lokensgard JR, Peterson PK. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *J Ethnopharmacol.* 2005; 102(2):158-163.
50. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjeva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol.* 1999; 64:235-240.
51. Maichuk IF, Orlovskaja LE, Andreev VP. The use of ocular drug films of propolis in the sequelae of ophthalmic herpes. *Voen Med Zn.* 1995; 80(12):36-39.
52. Schnitzler P, Neuner A, Nolkemper S, Zundel C, Nowack H, Sensch KH, Reichling J. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytother Res.* 2010; 24(1):20-28.
53. Shimizu T, Hino A, Tsutsumi A, Park YA, Watanabe W, Kurokawa M. Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. *Antivir Chem Chemother.* 2008; 19(1):7-13.

54. Liu AL, Wang HD, Lee SM, Wang YT, Du GH. Structure-activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. *Bioorg Med Chem*. 2008; 16(15):7141-7147.
55. Vynograd N, Vynograd I, Sosnowski Z. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine*. 2000; 7(1):1-6.
56. Xu BH, Shi MZ. An in vitro test of propolis against *Trichomonas vaginalis*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. 2006; 24(6):477-478.
57. De Castro SL, Higashi KO. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Ethnopharmacol*. 1995; 46(1):55-58.
58. Machado GM, Leon LL, De Castro SL. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102(1):73-77.
59. Abdel-Fattah NS, Nada OH. Effect of propolis versus metronidazole and their combined use in treatment of acute experimental giardiasis. *J Egypt Soc Parasitol*. 2007; 37(2):691-710.
60. Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SA, Dandiya PC. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol*. 1991; 35(1):77-82.
61. Omar RM. Chemical characterization of Nigerian red propolis and its biological activity against *Trypanosoma Brucei*. *Phytochem Anal*. 2016; 27(2):107-115.
62. Falcao SI, Vale N, Cos P, Gomes P, Freire C, Maes L, Vilas-Boas M. In vitro evaluation of Portuguese propolis and floral sources for antiprotozoal, antibacterial and antifungal activity. *Phytother Res*. 2014; 28(3):437-443.
63. Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, da Rocha Pasin F, Tsvetkova I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2006; 3(2):249-254.
64. Hegazi AG, Abd El Hadyb FK, Abd Allah FA. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z Naturforsch C*. 2000; 55(1-2):70-752.
65. Kaya S, Kurucu S, Topçu G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *J Ethnopharmacol*. 2003; 86:69-73.
66. Stepanović S, Antić N, Dakić I, Švabić-Vlahović M. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microb Res*. 2003; 158(4):353-357.

67. Fernandes Jr A, Sugizaki MF, Fogo ML, Funari SRC, Lopes CAM. In vitro activity of propolis against bacteria and yeast pathogens isolated from human infections. *J Venom Anim Toxins*. 1995; 1(2):63–69.
68. Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, Shimizu MT. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*. 2001; 44:375-378.
69. Nakajima Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complement Altern Med*. 2009; 9:4.
70. Gregoris E, Stevanato R. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. *Food Chem Toxicol*. 2010; 48(1):76-82.
71. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*. 2004; 84:329-339.
72. Farooqui T, Farooqui AA. Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: a critical review. *Curr Nutr Food Sci*. 2010; 6:186-199.
73. Bassani-Silva S, Sforcin JM, Amaral AS, Gaspar LFJ, Rocha NS. Propolis effect in vitro on canine transmissible venereal tumor cells. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 2007; 102:261–265.
74. Búfalo MC, Candeias JM, Sforcin JM. In vitro cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2009; 6(4):483-487.
75. Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol*. 2007; 113(1):1-14.
76. Sforcin JM, Kaneno R, Funari SRC. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. *J Venom Anim Toxins*. 2002; 8:19–29.
77. Orsolić N, Knezević AH, Sver L, Terzić S, Basić I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J Ethnopharmacol*. 2004; 94(2-3):307-315.
78. Khayyal MT, el-Ghazaly MA, el-Khatib AS, Hatem AM, de Vries PJ, el-Shafei S, Khattab MM. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003; 17(1):93-102.

79. Shinmei Y, Yano H, Kagawa Y, Izawa K, Akagi M, Inoue T, Kamei C. Effect of Brazilian propolis on sneezing and nasal rubbing in experimental allergic rhinitis of mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2009; 31(4):688-693.
80. Giada MLR. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. U: Morales-Gonzalez JA. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants.* InTech; 2013.
81. Najafi MF, Vahedy F, Seyyedini M, Jomehzadeh HR, Bozary K. Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. *Cytotechnology.* 2007; 54(1):49-56.
82. Kazazić SP. Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju.* 2004; 55:279-290.
83. Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology.* 2002; 177(1):91-104.
84. Takaisi-Kikuni NB, Schilcher H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med.* 1994; 60(3):222-227.
85. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol Res.* 1997; 152(3):239-246.
86. Búfalo MC, Figueiredo AS, de Sousa JP, Candeias JM, Bastos JK, Sforcin JM. Antipoliiovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *J Appl Microbiol.* 2009; 107(5):1669-1680.
87. Heinrich M, Modarai M, Kortenkamp A. Herbal extracts used for upper respiratory tract infections: are there clinically relevant interactions with the cytochrome P450 enzyme system? *Planta Med.* 2008; 74(6):657-660.
88. Antioksidansi- spasioci našeg tijela. Dostupno na: www.adiva.hr, 10. srpnja 2017.

8. SAŽETAK

Upotreba propolisa kao smole ljekovitih svojstava poznata je još od pradavnih vremena. Propolis je smolasta smjesa koju pčele prikupljaju sa pupoljaka stabala ili kore različitih drveća te koriste u košnici. Sastoji se od oko 50% balzama i smola (flavonoidi i ostali fenolni spojevi), 30% pčelinjeg voska, 10% isparljivih spojeva, 5% peludi i 5% različitih organskih komponenti i minerala. Propolis se ne može koristiti kao sirovi materijal, već se treba pročistiti ekstrakcijom s otapalima.

Dokazana su mnoga biološka djelovanja propolisa: antibakterijsko, antivirusno, antigljivično, antiparazitno, antioksidacijsko, imunostimulirajuće, antitumorsko, zacjeljujuće, protuupalno, hepatoprotektivno, antiulcerozno, antihipertenzivno, anestetsko, hipoglikemijsko i dr.

Najvažnije farmakološki aktivne komponente propolisa su flavonoidi, različiti fenoli te isparljivi spojevi.

9. SUMMARY

The use of propolis as a resin with curative properties is known from ancient times. Propolis is a resinous substance collected by honeybees from leaf buds and bark of various plants and used in the hive. It is composed of 50% resin (composed of flavonoids and other phenolic compounds), 30% wax, 10% volatiles, 5% pollen and 5% various organic compounds and minerals. Propolis cannot be used as raw material, and it must be purified by extraction with solvents.

Many biological activities of propolis have been reported: antibacterial, antiviral, antifungal, antiprotozoan, antioxidant, immunostimulating, antitumor, tissue regenerative, anti-inflammatory, hepatoprotective, antiulcer, antihypertensive, anesthetic, hypoglycemic, etc.

The most important pharmacologically active constituents in propolis are flavonoids, various phenolics and volatiles.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Andrea Kljenak

Datum i mjesto rođenja: 11. ožujka 1993. godine, Split, Republika Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

OBRAZOVANJE

- **2011.- 2017.** Kemijsko-tehnološki i Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacije
- **2007.- 2011.** Gimnazija Dr. Mate Ujevića, Imotski, smjer: opća gimnazija
- **2003.- 2007.** Osnovna škola "Tin Ujević", Krivodol
- **1999.- 2003.** Osnovna škola "Tin Ujević, Područna škola Poljica

RADNO ISKUSTVO

3. 2016. – 9. 2016. Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije, Ljekarna Lučac

POSEBNE VJEŠTINE

Rad na računalu: MS Office, Eskulap 2000

Strani jezik: Engleski jezik- aktivno u govoru i pismu, Francuski jezik- aktivno u govoru i pismu

Vozačka dozvola: B kategorija

ČLANSTVO

CPSA Split (Udruga studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske)