

Sastav i utjecaj propolisa na ljudski organizam

Ešegović, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:395594>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Iva Ešegović
0058219723**

Sastav i utjecaj propolisa na ljudski organizam

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Kemija i biokemija hrane

Mentor: prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kemiju i biokemiju hrane

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Sastav i utjecaj propolisa na ljudski organizam

Iva Ešegović, 0058219723

Sažetak: Propolis je prirodna smolasta tvar, žute do tamnosmeđe boje, koju medonosne pčele (*Apis mellifera*) sakupljaju iz različitih biljnih izvora. Koristi se kao prirodni lijek još od antičkog doba pa sve do danas. Njegov kemijski sastav razlikuje se u uzorcima propolisa različitog geografskog i botaničkog podrijetla te je u njemu do sada identificirano više od 300 različitih spojeva. Propolis ne može biti korišten kao sirovina već se mora pročistiti ekstrakcijom otapalima, korištenjem raznih ekstrakcijskih metoda. Ovim postupkom uklanja se inertni materijal i izolira se polifenolna frakcija, koja uz ostale komponente doprinosi raznim biološkim svojstvima, koja su u ovom radu potkrijepljena rezultatima brojnih istraživanja. Među najvažnija svojstva propolisa ubrajaju se antimikrobna (antibakterijska, antifungalna, antivirusna), antiupalna, antioksidacijska i antitumorska svojstva.

Ključne riječi: propolis, polifenoli, biološka svojstva, metode ekstrakcije

Rad sadrži: 22 stranice, 2 slike, 1 tablica, 41 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević

Datum obrane: 30. lipanj 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Chemistry and Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Composition of propolis and its influence on human body

Iva Ešegović, 0058219723

Abstract: Propolis is a natural resinous substance of yellow to dark brown colour, collected by honeybees (*Apis mellifera*) from various plant sources. It has been used as a natural remedy since ancient times and continues to be used today. Its chemical composition varies in samples of propolis from different geographical and botanical origins, over 300 different compounds have been identified in it so far. Propolis cannot be used as a raw material and must be purified by extraction using various extraction methods. This process removes inert material and isolates the polyphenolic fraction, which, along with other components, contributes to various biological properties supported by the results of numerous studies. The most important properties of propolis are its antimicrobial (antibacterial, antifungal, antiviral), anti-inflammatory, antioxidant, and antitumor effects.

Keywords: propolis, polyphenols, biological properties, extraction methods

Thesis contains: 22 pages, 2 figure, 1 table, 41 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Irena Landeka Jurčević, Full professor

Thesis defended: June 30, 2023.

Sadržaj

1.UVOD	5
2.TEORIJSKI DIO	2
2.1. PROPOLIS	2
2.2. POVIJEST PROPOLISA	3
2.3. SASTAV PROPOLISA	4
2.3.1. FIZIKALNA I ORGANOLEPTIČKA SVOJSTVA PROPOLISA	4
2.3.2. KEMIJSKI SASTAV PROPOLISA	5
2.4. METODE EKSTRAKCIJE PROPOLISA	9
2.4.1. MACERACIJA	10
2.4.2. EKSTRAKCIJA PO SOXHLETU	10
2.4.3. EKSTRAKCIJA VISOKIM TLAKOM	11
2.5. BIOLOŠKA SVOJSTVA PROPOLISA	11
2.5.1. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE	12
2.5.2. ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE	14
2.5.3. ANTITUMORSKO DJELOVANJE	15
2.5.4. PROTUUPALNO DJELOVANJE	16
2.ZAKLJUČCI	18
3.POPIS LITERATURE	19

1. UVOD

Tijekom povijesti, ljudi su koristili pčelinje proizvode na različite načine. Drevne civilizacije su cijenile med zbog njegove slatkoće i ljekovitih svojstava. Pčelinji vosak se koristio za izradu svijeća i kozmetike. Propolis se primjenjivao u tradicionalnoj medicini, dok se pelud konzumirao zbog njegovih nutritivnih prednosti.

Propolis, često nazivan "pčelinjim ljepilom", prirodna je supstanca koju pčele sintetiziraju od smola sakupljenih s različitih biljnih izvora. Stoljećima je propolis imao važno mjesto u tradicionalnoj medicini zbog svojih raznolikih farmakoloških svojstava i terapijskog potencijala. Nedavna znanstvena istraživanja su dodatno otkrila njegovu fascinantnu kemijsku strukturu i dokazala njegovu učinkovitost u različitim zdravstvenim primjenama.

Kemijski sastav propolisa varira ovisno o geografskom položaju, biljnim izvorima i specifičnim tehnikama sakupljanja koje pčele koriste. Ta prirodna varijabilnost rezultira širokim spektrom biološki aktivnih spojeva prisutnih u propolisu, poput flavonoida, fenolnih kiselina, terpena i raznih drugih polifenolnih spojeva. Ti spojevi doprinose raznolikom nizu terapijskih svojstava povezanih s propolisom, uključujući antioksidativnu, protuupalnu, antimikrobnu, antifungalna, antivirusnu, imunomodulatornu i antikancerogenu aktivnost.

U ovom radu opisana je povijest propolisa, kemijski sastav te fizikalna i organoleptička svojstva. Nadalje, navode se neke od metoda ekstrakcije propolisa te njegova najvažnija biološka svojstva potkrijepljena raznim istraživanjima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PROPOLIS

Propolis je ljekoviti proizvod pčela, karakterističan je po svojoj smolastoj konzistenciji, ugodnom mirisu i boji koja se proteže od žute do tamnosmeđe (slika 1). Riječ propolis dolazi od grčkih riječi „pro“ – obrana i „polis“ – grad, što označava obranu grada, odnosno obrana košnice. Naziv objašnjavamo tako što pčele koriste propolis za zatvaranje pukotina u košnicama, poravnavaju unutrašnje plohe zidova košnica te štite ulaz u košnicu od uljeza. Propolis služi i kao termoregulator, prekrivanjem unutrašnjih stijenka košnice propolisom, pčele se štite od visokih ljetnih temperatura i osiguravaju stalne uvjete unutar košnice. Osim toga, pčele propolisom mumificiraju manje životinje koje dospiju u košnicu i u njoj uginu te na taj način sprječavaju njihovo raspadanje unutar same košnice. Najvažnija uloga propolisa bi bila dezinfekcija stanica saća prije izlijevanja mladih pčela, na taj način se pčele unutar košnice štite od raznih bolesti (Kuropatnicki i sur., 2013).



Slika 1. Propolis (Anonymous 1, 2023)

Propolis proizvode pčele roda *Apis*, dok geopropolis, koji se smatra drugom vrstom propolisa, proizvode bez-žalačne pčele, tj. rod *Meliponini* (Przybyłek i sur. 2019).

Prema Pravilniku o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda (NN 20/2000), propolis se definira kao pčelinji proizvod koji sadrži smolaste tvari koje pčele prikupljaju s pupoljaka drvenastih biljaka. Propolis koji se stavlja na tržište mora udovoljavati sljedeće uvjete:

1. mora sadržavati najmanje 35 % tvari koje se ekstrahiraju alkoholom,
2. ne smije sadržavati katran ni spojeve slične katranu, odnosno katranske smole,
3. ne smije sadržavati više od 5 % mehaničkih nečistoća ni dijelova pčela,
4. ne smije sadržavati više od 30 % voska.

2.2. POVIJEST PROPOLISA

Povijesni izvori pokazuju da se propolis koristi već više od 2 000 godina. Prvi spomen propolisa datira iz davnih vremena, prikaz pčela koje proizvode propolis pronađeni su na vazama koje potječu iz drevnoga Egipta. Egipćani su koristili propolis za balzamiranje leševa i povezivali su pčele s bogovima, što potvrđuje i činjenica da je jedan od faraonovih naziva bio „Kralj pčela“. Sa druge strane, stari Grci propolis su dodavali kao glavni sastojak parfema zvanog „poliantus“ (Martinotti i Ranzato, 2015).

Ljekovita svojstva propolisa otkrili su grčki i rimski liječnici Aristotel, Plinije Stariji, Aulo Kornelije Celzo, Galen i Pedanije Dioskorid (Anjum i sur., 2019).

Hipokrat, koji se ujedno smatra i ocem moderne medicine, bio je jedan od prvih liječnika koji je ovu biljnu tvar koristio za liječenje rana i čireva, kako vanjskih tako i unutarnjih.

Rimljani su također štovali pčele i propolis, Plinije Stariji spominje propolis u svome djelu *Naturalis Historia*, gdje opisuje praktičnu uporabu ove tvari. Propolis su također poznavali drevni Perzijanci, Arapi i Židovi. Hebrejska riječ za propolis je "tzori", opisana u Starom zavjetu kao terapijski balzam i sastavni dio tamjana. Arapi i Perzijanci su propolis koristili kao lijek za brojne bolesti i kao sredstvo za čišćenje (Kuropatnicki i sur., 2013).

U srednjem vijeku uporaba propolisa nije bila toliko popularna, ali znanje o njemu preživjelo je u tradicionalnoj narodnoj medicini, uglavnom na području Istočne Europe. Iz tog razloga se od otkrića penicilina, početkom dvadesetog stoljeća, često naziva "ruskim penicilinom". Jedna od najpoznatijih tradicionalnih primjena propolisa je njegova primjena kod zacjeljivanja rana, uglavnom u obliku tinktura na bazi alkohola koji se koristi kao dezinficijens. Osim toga u narodnoj medicini se koristi za liječenje opekline, čireva i drugih rana koje teško zacjeljuju.

Zanimanje za propolis vratilo se s renesansom, kada su ponovno otkriveni neki stari i zaboravljeni tretmani. John Gerard u svom djelu Povijest biljaka (1597.) osvrnuo se na uporabu propolisa za izradu masti koje blagotvorno djeluju na upale i modrice (Kuropatnicki i sur., 2013).

Za vrijeme Drugog Anglo-burskog rata i Drugog svjetskog rata liječnici su pokušali koristiti propolis za regeneraciju tkiva i zacjeljivanje rana, kao i za liječenje tuberkuloze, upale pluća i pothranjenosti (Lotfy, 2006). Od tada se uporaba propolisa postupno širila i sada je popis njegovih primjena gotovo beskrajan. Koristi se za liječenje psorijaze, gingivitisa, stomatitisa, reumatskih poremećaja, pa čak i uganuća. Nalazi se u sastavu brojnih dodataka prehrani (Kharsany i sur., 2019).

Između 17. i 20. stoljeća propolis je postao vrlo poznat u Europi uglavnom zbog svojih antibakterijskih svojstava, era intenzivnih znanstvenih istraživanja o toj tvari započinje tek na prijelazu iz 19. u 20. stoljeće. Pokazalo se da ovaj pčelinji proizvod ima širok spektar terapijskih učinaka i sadrži više od 300 različitih komponenata (Anjum i sur., 2019).

2.3. SASTAV PROPOLISA

2.3.1. Fizikalna i organoleptička svojstva propolisa

Boja propolisa može varirati od žute sve do tamnosmeđe boje. Propolis ima okus po vaniliji, vosku, medu te pupoljcima topole, ali može imati i gorak okus. Specifična težina propolisa pri temperaturi od 20 °C je od 1,11 do 1,14 g/cm³. Konzistencija propolisa ovisi o promjeni temperature te povišenjem temperature propolis postupno omekšava te je podložniji oblikovanju: na temperaturama od 25 do 45 °C propolis je mekana, savitljiva i ljepljiva tvar; na temperaturama višim od 45 °C ljepljivost se povećava; u tekuće stanje prelazi na temperaturama od 60 do 70 °C iako u nekim slučajevima temperatura tališta doseže i 100 °C; kad je zamrznut ili blizu točke zamrzavanja te pri temperaturama nižim od 15 °C on postaje tvrd i lomljiv. Propolis se bolje otapa u vrućoj nego u hladnoj vodi (od 7 do 10 %), dok se u eteru koji je zagrijan do 123 °C otapa i do 66 %. U etilnom alkoholu topljivost je od 50 do 75 %, a u acetonu od 20 do 40 %. Topljivost ovisi o vremenskom trajanju ekstrakcije, temperaturi otapala i o veličini čestica, poželjno je da je veličina čestica što manja odnosno da je propolis u obliku praha. Najbolja topljivost se postiže kada se otapa u smjesi alkohola i etera ili kloroforma i alkohola (Mujić, 2014).

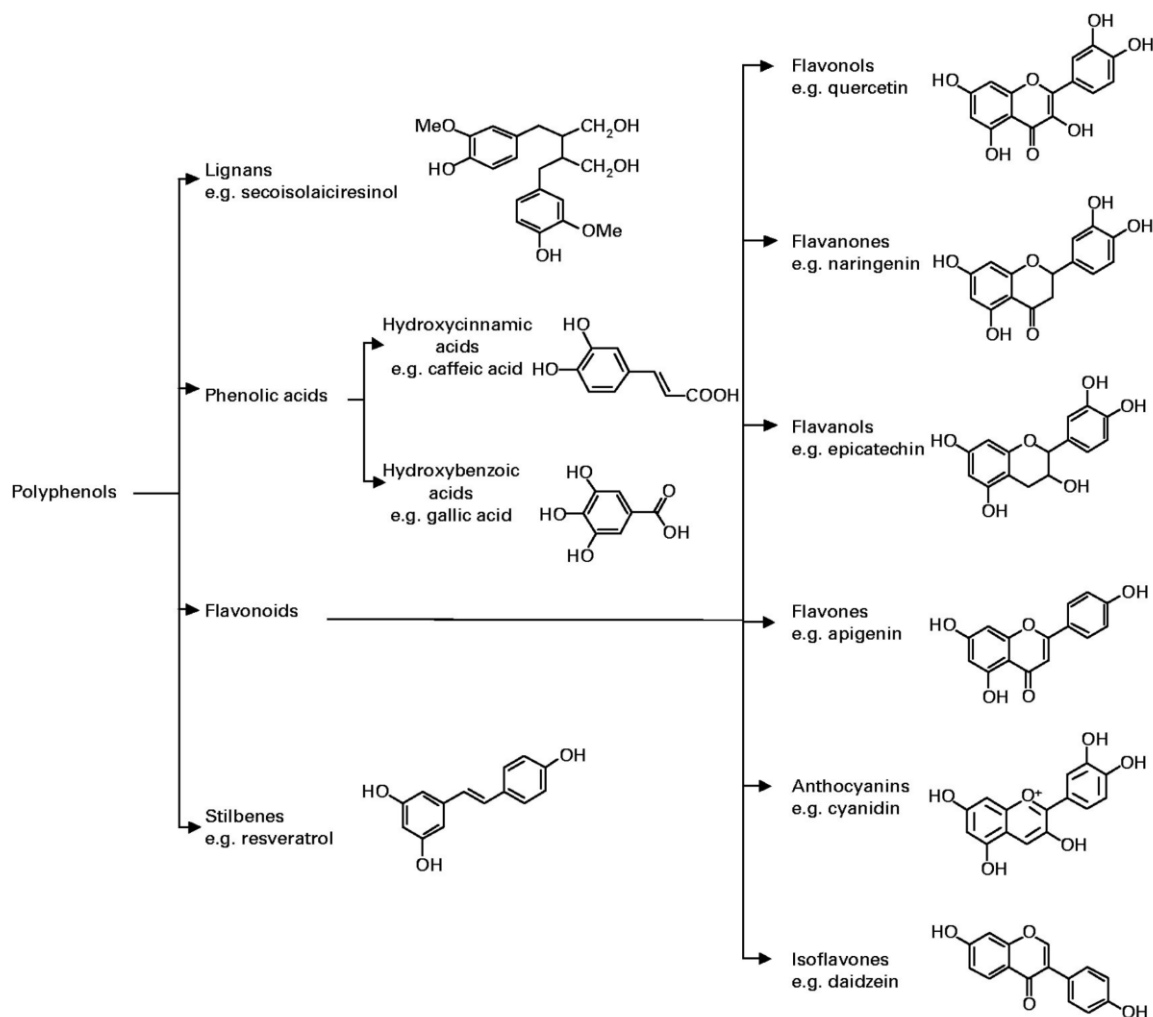
2.3.2. Kemijski sastav propolisa

Kemijski sastav propolisa varira ovisno o njegovom podrijetlu kojeg karakterizira geografski položaj, klimatske promjene te vrste biljke s kojega su ga pčele sakupljale. Pčele pri proizvodnji propolisa prikupljaju različite sastojke s različitih dijelova biljaka odnosno tvari koje biljke izlučuju aktivno, ali i tvari koje se ispuštaju iz određenih ranjenih dijelova biljke kao npr. smola, lateks i guma. Različiti kontinenti, područja i biljne vrste koje pčele upotrebljavaju za proizvodnju propolisa čine njegov sastav međusobno različit. No iako se razlikuju u kemijskom sastavu, djelovanja su ista (Przybylek i sur., 2019).

Uobičajeni sastav propolisa čini 50 % biljnog balzama i smole, 30 % pčelinjeg voska, 10 % esencijalnih i aromatičnih ulja, 5 % peludi i 5 % drugih organskih i anorganskih molekula. Identificirano je više od 300 komponenti u uzorcima propolisa prikupljenih iz različitih regija kao što su polifenoli, terpeni, beta-steroidi, aromatski aldehidi i alkoholi (Bankova i sur., 2000).

Fenoli su jedna od najbrojnijih i široko rasprostranjenih skupina bioaktivnih molekula u biljnom kraljevstvu (slika 2). Oni su proizvodi sekundarnog metabolizma biljaka. Mogu se kretati od jednostavnih molekula, kao što su fenolne kiseline, do visoko polimeriziranih spojeva, poput tanina. Njihova najkarakterističnija značajka je aromatični prsten i alkoholna (-OH) skupina povezana s njim. Fenoli su također najzastupljeniji sastojci u propolisu, posebno onom podrijetlom iz topola. Prosječno, oni čine oko 28 ± 9 % ukupne mase propolisa vrste topola, od čega su 8 ± 4 % flavoni/flavonoli i 6 ± 2 % flavanon/dihidroflavonoli. Izolirani fenoli pripadaju brojnim različitim klasama spojeva, poput flavonoida, lignana, stilbena, fenilpropanoida i drugih, među kojima su flavonoidi najvažnije molekule u propolisu (Balasundram i sur., 2006).

Flavonoidi uvelike doprinose farmakološkom djelovanju propolisa te imaju širok spektar bioloških svojstava, poput antibakterijskih, antivirusnih i protuupalnih učinaka. Flavonoidi su posebne komponente propolisa te ih je do sada u propolisu identificirano i proučavano čak više od 150 vrsta. Prema kemijskoj strukturi flavonoidi prisutni u propolisu mogu se klasificirati u: flavone, flavonole, flavanone, kalkone, dihidrohalkone, izoflavone, izodihidroflavone, flavane, izoflavane i neoflavanoide (slika 2) (Asma i sur., 2022).



Slika 2. Kemijska struktura polifenola (Anonymous 2, 2023)

Flavonoidne skupine koje se uglavnom nalaze u propolisu uključuju sljedeće tvari: pinocembrin, rutin, luteolin, galangin, kempferol, katehin, naringenin, acacetin, pinostrobin, miricetin i druge (Pasupuleti i sur., 2017).

Terpeni i terpenoidi su najveća i najraznolikija skupina sekundarnih biljnih metabolita. Pojam "terpen" odnosi se na molekulu ugljikovodika, dok se pojam "terpenoid" odnosi na molekulu ugljikovodika koja je modificirana npr. dodatkom kisika. Oni su druga najveća i najvažnija skupina spojeva te najobilnije hlapljive komponente propolisa. Terpeni su jedna od glavnih biološki aktivnih tvari u propolisu i igraju glavnu ulogu u određivanju njegove kvalitete. Uglavnom se nalaze u tropskom propolisu te rjeđe u propolisu vrste topola, no neki od njih također su izolirani iz propolisa mediteranskog tipa. Seskviterpeni su glavna skupina terpena koja se nalazi u propolisu te se dalje dijele na acikličke, monocikličke, dicikličke i tricikličke seskviterpene. Ostali važni terpeni iz propolisa su monoterpeni, diterpeni i triterpeni

(Huang i sur., 2014).

Propolis sadrži i aromatske organske kiseline kao što su benzojeva, cimetna, sorbinska, kofeinska i kumarna kiselina, alkohole poput fenetil-alkohol i izopentenil, aminokiseline (arginin, alanin, izovalin, fenilalanin, prolin, histidin, leucin, metionin, treonin...) te parafine, sterole, više masne kiseline, polisaharide itd. U usporedbi sa ostalim pčelinjim proizvodima, propolis u svome sastavu ne sadrži hormonske sastojke pčele ili lipide.

Sukcinat dehidrogenaza, glukoza-6-fosfataza, adenzin-trifosfataza i kiselna fosfataza neki su od enzima koji se mogu pronaći u sastavu propolisa (Pasupuleti i sur., 2017). Minerali pronađeni u propolisu su: Ca, K, Na, Mg, Fe, Si, Zn, Se, Cu, Ni, Al, Cr, Ba, Mn i Sr (Przybyłek i sur., 2019). Analiza prisutnosti elemenata u tragovima u propolisu može se koristiti za identifikaciju različitih uzoraka propolisa. Pb, Hg, As i Cd neki su od toksičnih elemenata koji su pronađeni u propolisu, posebice u uzorcima propolisa iz industrijskih i zagađenih područja, zbog čega se analize elemenata prisutnih u sirovom propolisu mogu koristiti i kao pokazatelj zagađenja okoliša (Huang i sur., 2014). Propolis također sadrži važne vitamine, poput vitamina B1, B2, B6, C i E (Lotfy, 2006).

Tablica 1. Prikaz kemijskog sastava propolisa (Anjum i sur., 2019)

KOMPONENTE
Flavonoidi, flavanoni, flavoni i flavonoli islapinin, ermanin, pektolarigenin, sakuranetin, isosakuranetin, 3-acetil pinobanksin, betuletol, izorhamnetin, kemferid, ramnazin, ramnetin, alnusin, alpinetin, alnusitol, pinostrobin, pinocembrin, krizin, tektokrizin, akacetin, ramnocitrin, kvercetin, galangin, apigenin, pinobanksin, kemferol, rutin, katehin, luteolin, naringenin
Alifatski ugljikovodici 1-oktadecen, trikozan, pentakozan, eikozan, heneikozan, eikozin
Derivati benzaldehida vanilin, kapronski aldehidi, izovanilin phidroksibenzaldehid, protokatehualdehid
Cinamil alkohol, cimetna kiselina i njeni derivati cinamilni alkohol, hidrocefinska kiselina, izoferulična kiselina, metil ester cimetne kiseline, etil ester cimetne kiseline, cinamiliden octena kiselina, cimetna kiselina, kofeinska kiselina, ferulinska kiselina
Benzojeva kiselina i derivati benzojeva kiselina, salicilna kiselina, gentizinska kiselina, galna kiselina, fenilmetil ester, fenilmetil ester salicilne kiseline, transkoniferil benzoat, trans-p-kumaril benzoat, protokatehuinska kiselina

Šećeri

d-ribofuranoza, d-fruktoza, d-glucitol, d-guloza, taloza, saharoza, d-glukoza

Vitamini

B1, B2, B6, C, E

Nikotinska kiselina, pantotenska kiselina, halkoni i dihidrohalkoni

alpinetin kalkon, naringinen kalkon, pinobanksin kalkon, pinobanksin-3-acetat kalkon, pinostrobin kalkon, pinocembrin kalkon, sakuranetin kalkon, 2',6'-atrihidroksi-4'-metoksi kalkon, 2',6-dihidroksi-4'-metoksidihidro halkon, 2',4',6-trihidroksidihidro kalkon

Aminokiseline

alanin, b-alanin, a-amino maslačna kiselina, d-amino maslačna kiselina, arginin, asparagin, asparaginska kiselina, cistein, glutaminska kiselina, glicin, histidin, hidroksiprolin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, ornitin, fenilalanin, prolin, piroglutaminska kiselina, sarkozin, serin, treonin, triptofan, tirozin, valin

Esteri

metil palmitat, cinamil-trans-4-kumarat, etil palmitat, stearinska kiselina metil ester, ftalat ester, benzil benzoat, benzil-trans-4-kumarat, 3-metil-3-butenil izoferulat, 3-metil-2-butenil izoferulat, 3-metil-3-butenil kafeat, 2-metil-2-butenil kafeat, 3-metil-2-butenil kafeat, benzil kafeat, feniletil kafeat, cinamil kafeat, tetradecil kafeat, tetradecenil kafeat, tetradecenil kafeat (izomer) b, tetradecenil kafeat, heksadecil kafeat

Steroli i steroidni ugljikovodici

kolesterol, stigmasterol, b-dihidrofukosterol, lanosterol

Alkohol, ketoni, fenoli i heteroaromatski spojevi

benzil alkohol, heksadekanol acetat, kumarin, pterostilben, ksantorija, skopoletin

Terpen, seskviterpen, alkohol i derivati

acetoksibetulenol terpen, geraniol, neroledol, b-bisabolol, guaio1, farnisol, dihidroeuodesmol

Seskviterpenski i triterpenski ugljikovodici

b-pačulen, b-bisabolen, skvalen, b-burbonen, kopaen, kalaren, kalamenen, kariofilen, pačulan, selenen, aromadendren

Minerali

Sr, Ba, Cd, Sn, Pb, Ti, Ag, Co, Mo, Al, Si, V, Ni, Mn, Cr Na, Mg, Cu, Ca, Zn, Fe, K

Enzimi

glukoza-6-fosfataza, kisela fosfataza, adenzin trifosfataza, sukcininska dehidrogenaza

Ketoni

p-acetofenolacetofenon, dihidroksi-acetofenon, metilacetofenon, hept-5-en-2-on, 6-metilketon, acetofenon

Voštane kiseline

arhidna kiselina, behenska kiselina, cerotična kiselina, laurinska kiselina, linoleinska kiselina, lignocerinska kiselina, montanska kiselina

Alkoholi

benzol metanol, cinamil alkohol, glicerol, glicerofosfat, fenetil alkohol, izobutenol, hidrokinon, prenil alkohol

Masne kiseline (C7-C18 kiseline) i ostali spojevi Fosforna kiselina, 1,4- dihidroksi benzen, 4-hidroksi-benzaldehid, 4-hidro acetofenon, 1,2,4-trihidroksi butan, 1,2,3-trihidroksi butanal i njegov izomer, miristicin, 2,4-bis(dimetil benzil)-6-t-butil fenol, 1,8-dihidroksi-3-metil antrakinon, miristicin

Ostale kiseline i derivati

etil ester palmitinske kiseline, miristinska kiselina, sorbinska kiselina, butil-2- metilpropil ester ftalne kiseline, stearinska kiselina, metilni ester alnustinske kiseline

Alifatske kiseline

mliječna kiselina, hidroksioctena kiselina, jabučna kiselina, 5-hidroksi-n-valerijanska kiselina, mliječna kiselina, valerijska kiselina, jantarna kiselina, valerinska kiselina, arabinska kiselina, nonanska kiselina, palmitinska kiselina, oleinska kiselina, dekanska kiselina, dodekanska kiselina, tetradekanska kiselina, heptadekanska kiselina, oktadecenska kiselina, tetrakozanska kiselina, eikozanska kiselina, heksakozanska kiselina, heksakozanska kiselina

2.4. METODE EKSTRAKCIJE PROPOLISA

Postupak ekstrakcije je ključan u oslobađanju bioaktivnih sastojaka propolisa. Odabir odgovarajućeg načina ekstrakcije ima veliki utjecaj na proizvodnju visokokvalitetnih proizvoda koji sadrže propolis. Uobičajena metoda je ekstrakcija čvrsto-tekuće tvari, koja koristi etanol u različitim koncentracijama, metanol ili vodu. Ekstrakt sadrži aminokiseline, flavonoide, terpene i derivate cimetine kiseline. Vodeni ekstrakt također sadrži lektine (Coneac i sur., 2008).

Međutim, ovo nije jednostavan zadatak s obzirom da se kemijski sastav propolisa značajno razlikuje. To je zbog toga što pčele koriste različite biljne izvore prikupljanja propolisa u različitim fitogeografskim i klimatskim zonama. Stoga postoji nekoliko različitih vrsta propolisa s karakterističnim kemijskim profilima te pristup koji je najbolji za ekstrakciju jedne vrste možda nije prikladan za drugu.

Propolis potječe iz biljnih smola, ima vrlo nisku topljivost u vodi, ali se lako otapa u organskim otapalima. Razlog tome je činjenica da su smole koje čine propolis relativno

nepolarnog karaktera, neovisno o njihovoj kemijskoj strukturi (Azwanida, 2015).

Neke od metoda koje se koriste za ekstrakciju propolisa su: maceracija, ekstrakcija po Soxhletu, ultrazvučna ekstrakcija, mikrovalna ekstrakcija, ekstrakcija superkričnim CO₂, ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom, ekstrakcija čvrste faze itd.

2.4.1. Maceracija

Maceracija je najčešće korištena tradicionalna metoda za ekstrakciju aktivnih sastojaka propolisa. Postoje mnoga istraživanja posvećena ovoj metodi koja proučavaju utjecaj različitih parametara na učinkovitost procesa ekstrakcije, uključujući vrstu otapala, omjer čvrsto-tekuće tvari, vrijeme ekstrakcije i temperaturu. Najčešće se koristi smjesa etanola i vode; utjecaj udjela etanola i omjera čvrsto-tekuće tvari proučavan je od strane mnogih. Optimalna koncentracija etanola u vodi obično se kreće između 70 i 95 % alkohola, no najčešće je između 70 i 80 %. Utvrđeno je da su ekstrakti etanola i metanola pokazali veću antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s ekstraktima vode, etil acetata, kloroforma i benzena (Ma i sur., 2016).

Isti rezultati su se dobili za različite vrste propolisa iz različitih geografskih i biljnih izvora, kao što su brazilski, kineski, malezijski i drugi. Vrijeme ekstrakcije značajno se razlikuje, razlog tome može biti to što miješanje ili mućkanje nije uvijek dobro provedeno. Drugi faktor može biti različita veličina čestica ekstrahiranog materijala (Bankova i sur., 2021).

Analizom utjecaja pH vrijednosti na učinkovitost ekstrakcije otkriveno je kako je voda, pri baznoj vrijednosti, izdvojila veće količine fenolnih spojeva i flavonoida u usporedbi s ekstraktima vode kod kojih se pH nije mijenjao. Međutim, nisu se dobili isti rezultati i u slučaju s ekstraktom etanola (Mello i Hubinger, 2012).

Također, istraživao se i utjecaj promjene temperature na učinkovitost ekstrakcije. Povećanje temperature rezultiralo je skraćanjem vremena ekstrakcije sa smjesama vode i etanola, kao i s drugim otapalima. Optimalna temperatura za postizanje kratkog vremena ekstrakcije i maksimalnog prinosa aktivnih sastojaka je 70 °C (Oldoni i sur., 2015).

2.4.2. Ekstrakcija po Soxhletu

Ekstrakcija po Soxhletu je jedna od metoda koja se često koristi za izdvajanje bioaktivnih molekula propolisa. Utjecaj parametara ekstrakcije poput korištenog otapala (kloroform, etanol, etil acetat, voda i smjesa etanola i vode) i vremena ekstrakcije (od 2 do 24

sata) proučen je na temelju prinosa ekstrakta odnosno sadržaju ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti. Slično kao i kod ekstrakcije maceracijom, povećanje udjela etanola rezultira većim prinosom ekstrakcije (Zin i sur., 2018).

Na temelju raznih istraživanja došlo se do zaključka kako ekstrakcija Soxhletom u trajanju od 4 do 6 sati s apsolutnim etanolom pri 60 °C i omjerom 5:150 rezultira u najvećem prinosu ukupnih fenola i flavonoida. Mala količina otapala, recikliranje otapala te skraćeno vrijeme ekstrakcije neke su od prednosti ekstrakcije po Soxhletu u usporedbi sa maceracijom. Međutim, ovu metodu treba koristiti s oprezom iz razloga što dugotrajno izlaganje propolisa visokim temperaturama može biti poprilično štetno za njegove termolabilne spojeve (Monroy i sur., 2017).

2.4.3. Ekstrakcija visokim tlakom

Proteklih godina razvijene su napredne metode ekstrakcije visokim tlakom sa namjerom smanjenja ekološkog onečišćenja i povećanja prinosa uz smanjenje troškova. Sa istom namjerom razvijene su i metode poput ultrazvučne ekstrakcije, mikrovalne ekstrakcije i ekstrakcije superkričnim CO₂. Ovaj proces temelji se na primjeni hidrauličke sile koja se kreće od 100 MPa do 800 MPa ili više te korištenje istih otapala kao i kod tradicionalne metode ekstrakcije. Visoki tlak nam omogućava prijelaz faze iz jednog oblika u drugi, promjenu dinamike reakcije i molekularne strukture, na taj način reakcija ide u smjeru koji potiče smanjenje volumena i time se povećava učinkovitost same ekstrakcije. Što je hidrostatski tlak veći, to više otapala može prodrijeti u matricu i na taj način povećati učinkovitost ekstrakcije (Khan i sur., 2019).

Ovaj pristup je pokazao uspješne rezultate pri ekstrakciji turskog propolisa sa smjesom etanola i vode. Ekstrakt je pokazao visoku antiradikalnu aktivnost. Negativna strana ove metode je ta što zahtjeva posebnu i visoko specijaliziranu opremu koja je izrazito skupa (Erdogan i sur., 2011).

2.5. BIOLOŠKA SVOJSTVA PROPOLISA

Biološka aktivnost propolisa uvelike ovisi o njegovom kemijskom sastavu. Poznavanje kemijskog sastava propolisa omogućava predviđanje njegovih bioloških aktivnosti. Općenito, pojam biološke aktivnosti opisuje farmakološku aktivnost tvari u živom organizmu. Kada

terapijski proizvod predstavlja kompleksnu smjesu, kao u slučaju s propolisom, biološka aktivnost može biti široko zasnovana zbog više aktivnih sastojaka, što rezultira brojnim farmakološkim aktivnostima (Jackson i sur., 2007).

Među najvažnija svojstva propolisa ubrajamo antimikrobna, antiupalna, antioksidacijska i antitumorska. Također, propolis ublažava različite upale te uklanja slobodne radikale. Svojstva poput antibakterijskog i antifungalnog djelovanja zajednička su svim vrstama propolisa, jedina razlika je u kemijskim spojevima koji su zaslužni za ta svojstva. Na primjer, kod europskog propolisa, antibakterijska svojstva proizlaze iz prisutnosti spojeva kao što su flavoni, flavanoni, fenolne kiseline i njihovi esteri. Kod brazilske vrste propolisa, ta svojstva su rezultat prisutnosti prenilirane kumarinske kiseline i diterpena, dok kod kubanskog crvenog propolisa, riječ je o preniliranim benzo-fenonima.

2.5.1. Antimikrobno djelovanje

Flavonoidi, aromatske kiseline i esteri prisutni u propolisu odgovorni su za antibakterijska svojstva propolisa. Najučinkovitiji flavonoidi u borbi protiv bakterija su galagin, pinocembrin, kvercetin, narigin, kirizin i apigenin. Propolis ne izaziva rezistentnost kod bakterija, što znači da mu se bakterije ne mogu prilagoditi. U usporedbi s antibioticima, propolis ima slabije djelovanje, ali je manje toksičan, ne oštećuje prirodnu crijevnu mikrofloru. Djeluje sinergistički s određenim antibioticima, što ubrzava proces oporavka. Mehanizam djelovanja propolisa na bakterijske stanice je kompleksan. Sprječava staničnu diobu, čime inhibira rast bakterija. Oštećuje citoplazmu, citoplazmatsku membranu i staničnu stijenku bakterija, uzrokujući djelomičnu bakteriolizu i inhibirajući sintezu proteina (Lotfy, 2006).

Antibakterijsku aktivnost propolisa i njegovih ekstrakata protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih sojeva bakterija pokazuje da propolis ima antibakterijsku aktivnost protiv širokog spektra gram-pozitivnih bakterija, dok je njegova aktivnost protiv gram-negativnih bakterija ograničena. Istraživanjem antibakterijskih i antifungalnih aktivnosti ekstrakata propolisa dobivenih ekstrakcijom acetonom i dimetil sulfoksidom iz 45 različitih uzoraka s područja Mugle u Turskoj, ustanovljeno je da antimikrobna aktivnost varira ovisno o uzorku i dozi propolisa te otapalu za ekstrakciju. Kod svih uzoraka antimikrobna aktivnost povećala se s povećanjem doze, ali nije dosegla maksimalnu razinu pri najvišoj testiranoj dozi. Ekstrakti dimetil sulfoksida svih uzoraka propolisa su bili aktivniji od acetonskih ekstrakata istih uzoraka, ali u slučaju bakterije *Brucella melitensis*, acetonski ekstrakti su pokazali veću

aktivnost. Kao najosjetljiviji mikroorganizmi na propolis pokazali su se *Shigella sonnei* u skupini gram-negativnih bakterija i *Streptococcus mutans* u skupini gram-pozitivnih bakterija (Ugur i Arslan, 2004).

Antifungalno djelovanje ovisi o sastojcima propolisa kao što su p-kumarinska kiselina, kofeinska kiselina, 3-acetil pinobaksin, pinobaksin-3-acetat i pinocembrin. Utvrđeno je da propolis inhibira aflatoksine, toksične spojeve nastale kao produkt metabolizma gljivica te smanjuje rast *Aspergillus flavus*. Propolis iz različitih geografskih regija pokazuje aktivnost protiv *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsisolis*, *C. tropicalis* i *Saccharomyces cerevisiae*.

Pinocembrin, jedan od sastojaka propolisa, pokazuje djelovanje na *Penicillium italicum* inhibirajući rast micelija te utječući na respiraciju i homeostazu energije patogena, što rezultira razaranjem stanične membrane i poremećajem metabolizma (Peng i sur., 2012). Australški propolis pokazuje antifungalnu aktivnost protiv *C. albicans*, što se pripisuje većoj koncentraciji pinocembrina (Banskota i sur., 2001).

Propolis pokazuje antivirusnu aktivnost zahvaljujući prisutnosti flavonoida, kofeinske kiseline i estera aromatskih kiselina. Antivirusno djelovanje provodi se djelomičnim blokiranjem ulaska virusa u stanicu, utječući na korake replikacije virusnog ciklusa unutar stanice te dovodeći do degradacije RNA prije samog ulaska virusa u stanicu ili nakon oslobađanja virusa u supernatantu (Búfalo i sur., 2009).

Provedena su istraživanja kojima je otkrivena aktivnost propolisa protiv poliovirusa, virusa influence tip A i tip B, adenovirusa, HSV-1 i HSV-2, vakcinija virusa, rotavirusa, virusa vezikularnog stomatitisa goveda te virusa Newcastle bolesti (Fokt i sur., 2010).

Brojna istraživanja su ukazivala na povezanost između antivirusne aktivnosti propolisa i određenih spojeva koji se u njemu nalaze. Utvrđeno je da neki flavonoidi imaju inhibicijski učinak na infekciju i replikaciju virusa humane imunodeficijencije (HIV). Također je utvrđeno kako je luteolin djelotvorniji od kvercetina, ali manje djelotvoran od kofeinske kiseline i nekih estera supstituirane cimetine kiseline koja se nalazi u propolisu. Izopentil-ferulat pokazao se djelotvornim kod narušavanja virulentnosti virusa influence tipa A. Primijećeno je kako je antivirusna aktivnost posljedica ne samo glavnih komponenti propolisa već i onih manje zastupljenih komponenti poput 3-metilbut-2-enil kafeata i 3-metilbutil ferulata, tako je 3-metilbut-2-enil kafeat pokazao značajan utjecaj na inhibiciju rasta HSV-1 (Marcucci, 1995).

2.5.2. Antioksidacijsko djelovanje

Antioksidacijske tvari su spojevi koji prisutni u mediju čak i u malim količinama imaju moć inhibiranja oksidacije supstrata. Mehanizam djelovanja antioksidacijskih tvari temelji se na inhibiciji slobodnih radikala putem donora elektrona ili vodika. Slobodni radikali su glavni uzročnici starenja stanica, artritisa, raka, dijabetesa, astme, kardiovaskularnih i drugih bolesti (Kuropatnicki i sur., 2013).

Antioksidacijsko djelovanje propolisa rezultat je visokog udjela polifenolnih spojeva, poput galangina i pinocembrina koje svrstavamo među flavonoide (Machado i sur., 2017). Vodeni ekstrakt propolisa, zbog većeg sadržaja polifenola, pokazao se učinkovitijim od etanolnog ekstrakta. Galangin se pokazao aktivnijim nego pinocembrin u oba slučaja, zbog njihove strukturne razlike (Wagh, 2013).

Sun i sur. (2015) proučavali su antioksidacijska svojstva ekstrakata propolisa kroz pet različitih testova. Prvi test se proveo korištenjem DPPH (2,2'-difetil-1-piridilhidrazil) metode, široko rasprostranjena, jednostavna i česta metoda za spektrofotometrijsko mjerenje ukupne antioksidacijske aktivnosti u prirodnim proizvodima. Rezultati ove metode mogu se prikazati na različite načine. Većina studija izražava rezultate kao vrijednost IC_{50} , koja se definira kao koncentracija antioksidansa potrebna za smanjenje početne koncentracije DPPH-a za 50 %. Niža vrijednost IC_{50} ukazuje na jaču antioksidacijsku aktivnost. Vrijednosti IC_{50} različitih ekstrakata propolisa varirale su od 13 798 $\mu\text{g/mL}$ do 633 $\mu\text{g/mL}$. IC_{50} vodenog ekstrakta propolisa i 25 % etanolnog ekstrakta propolisa otprilike su 10 puta veće od vrijednosti ostalih etanolnih ekstrakata propolisa. Posebno se istaknuo 75 % etanolni ekstrakt propolisa koji je pokazao najjaču aktivnost u uklanjanju DPPH radikala; njegova vrijednost IC_{50} bila je 633 $\mu\text{g/mL}$, puno niža od vrijednosti vodenog ekstrakta propolisa.

Druga metoda koja se koristila bila je ABTS metoda koja služi za određivanje sposobnosti uklanjanja radikala pomoću flavonoida i fenola, ova metoda je bolji izbor od DPPH metode zbog svoje veće osjetljivosti. Primijećeno je da je ABTS metoda dala slične rezultate kao i DPPH metoda te je 75 % etanolni ekstrakt propolisa ponovno pokazao najnižu vrijednost IC_{50} , što ukazuje na najvišu aktivnost u uklanjanju ABTS radikala.

ORAC metoda se koristila u trećem testu, to je metoda određivanja kapaciteta apsorpcije radikala kisika, relativno standardizirana metoda za mjerenje kapaciteta u biološkim uzorcima. Vrijednosti dobivene ovom metodom varirale su od 1 383 do 27 5954 $\mu\text{mol Trolox/100 g propolisa}$. 75 % etanolni ekstrakt propolisa pokazao je najveću vrijednost (27

5954 $\mu\text{mol Trolox}/100 \text{ g}$ propolisa), što je gotovo 200 puta veće od vrijednosti dobivene u slučaju sa vodenim ekstraktom propolisa.

Antioksidacijska aktivnost mjerila se i FRAP metodom koja mjeri antioksidansom uzrokovanu redukciju kompleksa feri-ion (Fe^{3+}) - ligand u intenzivno plavo obojeni fero- (Fe^{2+}) kompleks, u kiselom mediju. 75 % etanolni ekstrakt propolisa pokazao je najjaču redukcijsku sposobnost te je njegova vrijednost bila gotovo 15 puta veća nego vrijednost vodenog ekstrakta.

Posljednja metoda u ovom istraživanju bila je metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti na staničnim kulturama (eng. Cellular antioxidant activity assay, CAA assay). Ispitana je stanična antioksidacijska aktivnost ekstrakata propolisa na HepG2 stanicama. Kao i u svim ostalim testovima, 75 % etanolni ekstrakt pokazao se najučinkovitiji, stanična antioksidacijska aktivnost povećala se 150 puta u usporedbi sa vodenim ekstraktom propolisa.

2.5.3. Antitumorsko djelovanje

Propolis ima pozitivan učinak na antitumorsku terapiju. Antikancerogena aktivnost propolisa i njegovih spojeva temelji se na različitim mehanizmima kao što su: suzbijanje proliferacije stanica raka/prekanceroznih stanica putem njegovog imunomodulatornog učinka, smanjenje broja matičnih stanica raka koje su odgovorne za razvoj otpornosti na kemoterapiju i ponovno pojavljivanje raka nakon liječenja, blokiranje specifičnih signalnih putova onkogeni, geni koji snažno aktiviraju proces umnožavanja stanica, izvođenje antiangiogenih učinaka, moduliranje tumorskog mikrookruženja te kao dodatni ili komplementarni tretman postojećim konvencionalnim terapijama protiv raka (Chan i sur., 2012).

Cole i sur. (2010) proučavali su potencijalnu primjenu etanolnog ekstrakta australskog propolisa kao preventivnog lijeka protiv raka u kontekstu kronične upale kože, korištenjem mišjeg modela bez dlake s induciranom upalom uzrokovanom UV zračenjem. Na temelju rezultata istraživanja dokazano je kako propolis ima značajnu aktivnost, ovisno o korištenoj dozi, u zaštiti od opeklinškog edema i peroksidacije lipida. Također, pretjerano izražavanje IL-10 i smanjenje IL-12, što su karakteristični pokazatelji imunosupresije, bili su značajno smanjeni uz primjenu propolisa. Australski propolis je uspješno smanjio upalu kože, imunosupresiju i peroksidaciju lipida uzorkovanu izlaganjem UV zračenju te na temelju toga se može zaključiti da propolis može imati korisni zaštitni učinak protiv oštećenja kože i razvoja kožnog karcinoma kod ljudi.

Kimoto i sur. (2001) primijenili su Artepilin C (3,5-diprenil-4-hidroksicinaminska

kiselina), aktivni sastojak brazilskog propolisa koji posjeduje antitumorsku aktivnost, na ljudske stanične linije leukemije različitih fenotipa, kao što su limfocitna, mijeloična i monocitna leukemija. Artepilin C je pokazao snažne citocidne učinke i izazvao izražene razine apoptoze u svim staničnim linijama. Najjači učinci su primijećeni kod linija T-stanica. U staničnim linijama inducirana su apoptotska tijela i fragmentacija DNA. Sinteza DNA u stanicama leukemije jasno je inhibirana, a dezintegracija stanica je potvrđena mikroskopom. Apoptoza stanica leukemije djelomično može biti povezana s povećanim izražavanjem Fas antigena, proteina koji izaziva apoptozu i gubitkom membranskog potencijala mitohondrija. S druge strane, iako Artepillin C inhibira rast normalnih stimuliranih limfocita, nije citocidan prema normalnim nestimuliranim limfocitima. Ti rezultati sugeriraju da Artepillin C ima antileukemijske učinke s ograničenim inhibicijskim učincima na normalne limfocite.

Istraživanja o učinku oralnog kirizina (5,7-dihidroksiflavon), bioflavonoida koji se nalazi u propolisu te ima snažan inhibitorni učinak na aromatazu u modelu hepatokarcinoma izazvanog DEN-om kod štakora, su pokazala značajno smanjenje broja i veličine formiranih kancerogenih čvorova. Ovaj hepatoprotektivni učinak se također očitovao u smanjenju razina jetrenih enzima parenhima i žučnih kanalića u serumu (Khan i sur., 2011).

Sumirajući rezultate navedenih istraživanja, moguće je zaključiti da propolis sadrži smjesu spojeva čiji zbrojni učinci nemaju hepatoprotektivni učinak. Međutim, pojedinačni spoj se može ponašati drugačije od same smjese.

2.5.4. Protuupalno djelovanje

Propolis posjeduje protuupalno djelovanje kod akutnih i kroničnih upala zbog prisutnosti flavonoida koji kontroliraju aktivnost NADPH-oksidade, ornitin dekarboksilaze, mijeloperoksidaze, hijaluronidaze iz stanica gušterica te tirozin-kinaze (Lotfy, 2006).

Način djelovanja ovih spojeva je suzbijanje proizvodnje leukotriena i prostaglandina od strane bijelih krvnih stanica te usporavanje aktivnosti mijeloperoksidaze, ornitin dekarboksilaze, tirozin-kinaze i NADPH-oksidade (Machado i sur., 2017).

Enzim koji je često povezan s upalnim procesom je ciklooksigenaza-2 (COX-2), koji se pojavljuje u bolnim i upaljenim tkivima, dok je u zdravim tkivima uglavnom neaktivan. Drugi oblik ciklooksigenaze je ciklooksigenaza-1 (COX-1), taj oblik regulira proces homeostaze (Viuda-Martos i sur., 2008).

COX-2 pretvara arahidonsku kiselinu u prostaglandin, spoj koji povećava upalnu

reakciju u organizmu. Kako bi se umanjila upalna reakcija koriste se inhibitori tog enzima. Fenetil ester kofeinske kiseline (CAPE) ima veliki utjecaj na inhibiciju COX-2, CAPE inhibira oslobađanje arahidonske kiseline iz stanične membrane, suzbija aktivnost COX-1 i COX-2 te smanjuje aktivaciju gena COX-2.

Borrelli i sur. (2002) proveli su istraživanje gdje su ispitivali protuupalna svojstva dva etanolna ekstrakta propolisa, CAPE-a i galangina. Jedan ekstrakt je sadržavao CAPE, dok je drugi bio bez njega. Njihovo djelovanje je ispitivano na zaraženim štakorima s karageninskim edemom stopala, karageninskim pleuritisom i adjuvantnim artritisom. Rezultati su pokazali kako etanolni ekstrakt s CAPE-om i sam CAPE značajno djeluju na bolesti štakora. Nasuprot tome, etanolni ekstrakt bez CAPE-a i galangin nisu pokazali protuupalni učinak. Na temelju tog istraživanja možemo zaključiti kako CAPE ima značajnu ulogu u protuupalnim svojstvima propolisa.

Marquez i sur. (2004) su istraživali imunosupresivnu aktivnost CAPE-a u ljudskim T-stanicama, stanice koje igraju ključnu ulogu u nastanku nekoliko upalnih bolesti. Otkrili su kako je ovaj fenolni spoj snažni inhibitor ranih i kasnih događaja u aktivaciji T-stanica putem T-staničnih receptora. Osim toga otkriveno je da CAPE specifično inhibira transkripciju gena interleukina (IL)-2 i sintezu IL-2 u stimuliranim T-stanicama. Kako bi dodatno razjasnili djelovanje CAPE-a na transkripcijskoj razini, ispitivano je vezanje DNA i aktivnost transkripcijskih faktora: nuklearnog faktora kappa B (NF- κ B), nuklearnog faktora aktiviranih stanica (NFAT) i aktivatornog proteina-1 (AP-1). Utvrđeno je da CAPE inhibira vezivanje i transkripcijsku aktivnost NF- κ B i NFAT, koji su dva ključna transkripcijska faktora za aktivaciju T-stanica. Ovim ispitivanjima dobiveni su novi uvidi u molekularne mehanizme koji su uključeni u imunomodulatorno i protuupalno djelovanje propolisa.

2. ZAKLJUČCI

Na temelju informacija predstavljenih u ovom završnom radu mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Povijesna upotreba propolisa kroz različite civilizacije i kulture otkriva njegov trajni značaj kao prirodnog lijeka.
2. Znanstvena istraživanja kemijskog sastava i bioloških aktivnosti propolisa potvrdila su njegova antimikrobna, antivirusna, protuupalna i imunomodulatorna svojstva.
3. Na temelju kemijskog sastava propolisa i njegovih fizikalnih i organoleptičkih svojstava, možemo zaključiti da je propolis bogat bioaktivnim spojevima, kao što su flavonoidi, fenolne kiseline i terpeni.
4. Fizikalne karakteristike propolisa, poput ljepljive smolaste teksture, varijabilnih boja (od žute do tamno zelene), te karakteristične arome i okusa, čine ga pogodnim za kozmetičku, prehrambenu i farmaceutsku industriju.
5. Postoji nekoliko metoda ekstrakcije propolisa koje se koriste za dobivanje njegovih bioaktivnih spojeva, svaka od metoda u radu ima svoje prednosti i nedostatke. Etanolni ekstrakt propolisa u usporedbi s vodenim ekstraktom, odnosno ekstraktima dobivenim ekstrakcijom sa etil acetatom, kloroformom i benzenom često se smatra najboljim izborom zbog visokog udjela bioaktivnih spojeva, stabilnosti i široke primjene.
6. Potrebna su daljnja istraživanja i kliničke studije kako bi se u potpunosti razumjeli mehanizmi djelovanja propolisa i optimizirala njegova upotreba u specifičnim zdravstvenim stanjima.

3. POPIS LITERATURE

- Anonymous 1 (2023) Propolis, <https://beekeepclub.com/health-benefits-and-side-effects-of-propolis-explained>. Pristupljeno 08. svibnja 2023.
- Anonymous 2 (2023) Kemijska struktura polifenola, <http://healthjade.com/what-are-polyphenols/>. Pristupljeno 18. svibnja 2023.
- Anjum SI, Ullah A, Khan KA, Attaullah M, Khan HU, Ali H, i sur. (2019) Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J Biol Sci* **26**, 1695-1703. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013>
- Asma ST, Bobiř O, Bonta V, Acaroz U, Shah SRA, Istanbulugil F, i sur. (2022) General nutritional profile of bee products and their potential antiviral properties against mammalian viruses. *Nutrients* **14**, 3579. <https://doi.org/10.3390/nu14173579>
- Azwanida NN (2015) A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants* **4**, 1-6. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
- Balasundram N, Sundram K, Samman S (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chem* **99**, 191-203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Bankova VS, de Castro SL, Marcucci MC (2000) Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, **31**, 3-15. <https://doi.org/10.1051/apido:2000102>
- Bankova V, Trusheva B, Popova M (2021) Propolis extraction methods: A review. *J Apic Res* **60**, 734-743. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1901426>
- Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S (2001) Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* **15**, 561-571. <https://doi.org/10.1002/ptr.1029>
- Borrelli F, Izzo AA, Di Carlo G, Maffia P, Russo A, Maiello FM, i sur. (2002) Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia* **73**, 38-43. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(02\)00189-2](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(02)00189-2)
- Búfalo MC, Figueiredo AS, de Sousa JPB, Candeias JMG, Bastos JK, Sforcin JM (2009) Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell

viability determination and real-time PCR. *J Appl Microbiol* **107**, 1669–1680. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04354.x>

- Chan GCF, Cheung KW, Sze DMY (2013) The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clin rev allergy immunol* **44**, 262–273. <https://doi.org/10.1007/s12016-012-8322-2>
- Cole N, Sou PW, Ngo A, Tsang KH, Severino JA, Arun SJ, i sur. (2010) Topical ‘Sydney’ propolis protects against UV-radiation-induced inflammation, lipid peroxidation and immune suppression in mouse skin. *Int arch allergy immunol* **152**, 87–97. <https://doi.org/10.1159/000265530>
- Coneac G, Gafițanu E, Hădărugă DI, Hădărugă NG, Pînzaru IA, Bandur G, i sur. (2008) Flavonoid contents of propolis from the west side of Romania and correlation with the antioxidant activity. *Chem Bull Politehnica Univ* **53**, 56–60.
- Dealey C (2008) The care of wounds: A guide for nurses, 3. izd., Blackwell Publishing Ltd, London. <https://doi.org/10.1002/9780470774946>
- Erdogan S, Ates B, Durmaz G, Yilmaz I, Seckin T (2011) Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. *Food Chem Toxicol* **49**, 1592–1597. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.006>
- Fokt H, Pereira A, Ferreira A, Cunha A, Aguiar C (2010) How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. U: Proceedings of the II International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, Seville, Španjolska, str. 481–493. <https://doi.org/10.1142/7133>
- Huang S, Zhang CP Wang K, Li GQ, Hu FL (2014) Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* **19**, 19610–19632. <https://doi.org/10.3390/molecules191219610>
- Jackson CM, Esnouf MP, Winzor DJ, Duester DL (2007) Defining and measuring biological activity: applying the principles of metrology. *Accred Qual Assur* **12**, 283–294. <https://doi.org/10.1007/s00769-006-0254-1>
- Khan SA, Aslam R, Makroo HA (2019) High pressure extraction and its application in the extraction of bio-active compounds: A review. *J Food Process Eng* **42**, 12896. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12896>

- Kharsany K, Viljoen A, Leonard C, van Vuuren S (2019) The new buzz: Investigating the antimicrobial interactions between bioactive compounds found in South African propolis. *J Ethnopharmacol* **238**, 111867. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111867>
- Kimoto T, Aga M, Hino K, Koya-Miyata S, Yamamoto Y, Micallef MJ, i sur. (2001) Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. *Anticancer res* **21**, 221-228. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1500.1998.00020.x>
- Kuropatnicki AK, Szliszka E, Krol W (2013) Historical aspects of propolis research in modern times. *Evid Based Complement Alternat Med* **2013**, <https://doi.org/10.1155/2013/964149>
- Lotfy M (2006) Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev*, **7**, 22-31.
- Ma S, Ma H, Pan Z, Luo L, Weng L (2016) Antioxidant activities of propolis's extracts by different solvents in vitro. *J Chin Inst Food Sci Technol* **16**, 53-58. <https://doi.org/10.16429/j.1009-7848.2016.08.008>
- Machado B, Pulcino TN, Silva AL, Tadeu D, Melo RGS, Mendonça IG (2017) Propolis as an alternative in prevention and control of dental cavity. *J Apither* **1**, 47-50.
- Marcucci MC (1995) Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* **26**, 83-99. <https://doi.org/10.1051/apido:19950202>
- Márquez N, Sancho R, Macho A, Calzado MA, Fiebich BL, Muñoz E (2004) Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF-κB transcription factors. *J Pharmacol Exp Ther* **308**, 993-1001. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.060673>
- Martinotti S, Ranzato E (2015) Propolis: a new frontier for wound healing? *Burns trauma* **3**, 1-7. <https://doi.org/10.1186/s41038-015-0010-z>
- Mello BC, Hubinger MD (2012) Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different p H values. *Int J Food Sci Technol* **47**, 2510-2518. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03129.x>
- Monroy YM, Rodrigues RA, Rodrigues MV, Sant'Ana AS, Silva BS, Cabral FA (2017) Brazilian green propolis extracts obtained by conventional processes and by processes

- at high pressure with supercritical carbon dioxide, ethanol and water. *J Supercrit Fluids* **130**, 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.08.006>
- Oldoni TLC, Oliveira SC, Andolfatto S, Karling M, Calegari MA, Sado RY, i sur. (2015) Chemical characterization and optimization of the extraction process of bioactive compounds from propolis produced by selected bees *Apis mellifera*. *J Braz Chem Soc* **26**, 2054-2062. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150186>
 - Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH (2017) Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxid Med Cell Longev*, **2017**, 1259510. <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>
 - Peng L, Yang S, Cheng YJ, Chen F, Pan S, Fan G (2012) Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium italicum*. *Food Sci Biotechnol* **21**, 1533-1539.
 - Pravilnik (2000) Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda. Narodne novine **20**, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2000_02_20_280.html Pristupljeno 15. svibnja 2023.
 - Przybyłek I, Karpinski TM (2019) Antibacterial properties of propolis. *Molecules* **24**, 2047. <https://doi.org/10.3390/molecules24112047>
 - Sun C, Wu Z, Wang Z, Zhang H (2015) Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. *Evid Based Complementary Altern Med* **2015**, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/595393>
 - Ugur A, Arslan T (2004) An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *J Med Food* **7**, 90-94. <https://doi.org/10.1089/109662004322984761>
 - Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA (2008) Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *J Food Sci* **73**, 117-124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x>
 - Wagh VD (2013) Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv Pharmacol Pharmaceutic Sci*, 2013.
 - Zin NBM, Azemin A, Rodi MMM, Mohd KS (2018) Chemical composition and antioxidant activity of stingless bee propolis from different extraction methods. *Int Res J Eng Technol* **7**, 90–95.

Izjava o izvornosti

Ja Iva Ešegović izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis