

# Mehanizmi antibakterijskog djelovanja inovativnog ekstrakta propolisa

---

Vranješ, Mihaela

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:475880>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Mihaela Vranješ

Mehanizmi antibakterijskog djelovanja inovativnog ekstrakta propolisa

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

Zavod za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Zavod za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu

Predstojnik: doc. dr. sc. Krešimir Matanović

Mentori:

prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

dr. sc. Josipa Vlanić, Institut Ruđer Bošković

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Andreja Prevendar-Crnić

2. dr. sc. Josipa Vlanić

3. prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

4. doc. dr. sc. Krešimir Matanović (zamjena)

## ZAHVALE

Na kraju studiranja voljela bih se zahvaliti dobrim ljudima, stručnjacima i znanstvenicima koji su uljepšali i obilježili moje studentske dane.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ivani Tlak Gajger i komentorici dr. sc. Josipi Vlainić na povjerenju, podršci i smjernicama tijekom izrade i pisanja diplomskog rada. Tijekom nastave i rada u laboratoriju sam od Vas puno naučila te se nadam da ću stečeno znanje biti u prilici i primijeniti. Posebno se zahvaljujem svojoj prvoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jeleni Šuran na prenijetom znanju, podršci i suradnji te na iskrenom prijateljstvu. Neizmjereno sam Vam zahvalna što ste me smatrali članom Vašeg istraživačkog tima te što ste bili uz mene u lijepim i manje lijepim trenucima moga studiranja.

Zahvalila bih se i svim asistentima, docentima, profesorima i djelatnicima Veterinarskog fakulteta koji su prema meni bili uvijek susretljivi te su mi pružili priliku da se uključim u razne aktivnosti na fakultetu i izvan njega. Zbog Vas sam se na fakultetu osjećala kao kod kuće. Hvala i svim prošlim i sadašnjim članovima uredničkog odbora časopisa *Veterinar* na lijepoj i svrsishodnoj suradnji. Iskustvo stečeno provođenjem uredničke aktivnosti mi je poprilično pomoglo u pisanju ovog rada. Također, hvala i svim doktorima i doktoricama veterinarske medicine izvan fakulteta koji su sa mnom nesebično dijelili stečeno znanje i praktične savjete. Zahvalila bih se i svim kolegicama i kolegama koji su sa mnom za vrijeme studiranja učili, ponavljali i dijelili studentske klupe.

Najviše se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su me podupirali od samog početka. Bez vaše pomoći bi bilo gotovo nemoguće sve što sam ostvarila proteklih godina. Posebno hvala mome ocu Zlatku, baki Anđelki i djedu Josipu koji nažalost neće imati priliku pročitati ovaj diplomski rad. Bili ste moj glavni oslonac i upravo sam se zbog vas trudila na svakom ispitu dati svoj maksimum te se nadam da me pratite i čuvate s nekog ljepšeg mjesta. Zauvijek ćete biti u mojim mislima. Najveća hvala mojoj majci Andrijani na požrtvornosti, strpljenju, podršci i nezamislivoj količini ljubavi. Draga mama hvala ti što si mi oduvijek bila uzor i najbolji prijatelj te što si vjerovala da mogu postići sve što zamislim. Hvala i mojoj teti Marijani na podršci i ljubavi. Naša česta druženja su mi uvelike olakšala studiranje i život u Zagrebu. Posebno hvala i mom dragom psu Billyju na iskrenom prijateljstvu i na svakom osmjehu koji mi je izmamio tijekom ovih godina.

Naposljetku se zahvaljujem svom zaručniku Zvonimiru na ljubavi i podršci te na svim trenucima koje smo proveli zajedno od kojih su brojni prošli u učenju veterinarske medicine. Bez tebe studiranje ne bi bilo toliko lijepo i ispunjeno razdoblje moga života.

## POPIS KORIŠTENIH KRATICA

ACI – aktivni kozmetički sastojak (engl. *active cosmetic ingredient*)

ALT – alanin amnotransferaza

API – aktivni farmaceutski sastojak (engl. *active pharmaceutical ingredient*)

ARE – čimbenik antioksidacijskog/elektrofilnog odgovora (engl. *antioxidant/electrophile response element*)

ASE – ubrzana ekstrakcija otapalom (engl. *accelerated solvent extraction*)

AST – aspartat aminotransferaza

ATCC – engl. *American Type Culture Collection*

ATP – adenzin trifosfat

ATP-aza – enzim koji razgrađuje ATP

B16F1 – stanice mišjeg melanoma

C – atom ugljika

CAPE – fenil ester kavene kiseline (engl. *caffeic acid phenethyl ester*)

CCl<sub>4</sub> – ugljikov tetraklorid

CD4<sup>+</sup> – vrsta pomoćničkih T limfocita

CD8<sup>+</sup> – vrsta citotoksičnih T limfocita ili T stanice ubojice

CFU/ml – kolonijalne formirajuće jedinice (engl. *colony-forming units*) u mililitru

CT26 – stanice mišjeg karcinoma debelog crijeva

DER – omjer lijeka i ekstrakta (engl. *drug-to-extract ratio*)

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

DMH – 1,2-dimetilhidrazin

DPPH – antioksidacijski test mjerenja sposobnosti redukcije 2,2- difenil-1-pikrilhidrazila (engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)

dsDNA – dvolančana DNK (engl. *double-stranded DNA*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

EUCAST – engl. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

EtOH-H<sub>2</sub>O (v/v) – omjer volumena etanola i vode

FFI – funkcionalni sastojak hrane (engl. *functional food ingredient*)

FRAP – antioksidacijski test mjerenja redukcijske sposobnosti antioksidansa prema željezovom (III) ionu (engl. *ferric reducing antioxidant power*)

GC – plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*)

GS-MS – metoda plinske kromatografije i masene spektrometrije (engl. *gas chromatography – mass spectrometry*)

H1N1 – podtip virusa influence A, uzročnik svinjske gripe

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – vodikov peroksid

H3N2 – podtip virusa influence A

HDAC8 – enzim histonska deacetilaza 8

HeLa – besmrtna stanična linija izrasla iz uzorka stanica raka grlića maternice

HepG2 – stanice ljudskog hepatocelularnog karcinoma

HHPE – ekstrakcija pomoću visokog hidrostatskog tlaka (engl. *high hydrostatic pressure extraction*)

HIV-1 – virus humane imunodeficijencije tipa 1

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*)

HSV-1 – herpes simplex virus tipa 1

HSV-2 – herpes simplex virus tipa 2

ICH – Međunarodno vijeće za harmonizaciju tehničkih zahtjeva za lijekove za ljudsku upotrebu (engl. *International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use*)

IFN-  $\gamma$  – interferon gama

IgE – imunoglobulin E

IL-n – oznaka za razne interleukine (IL-2, IL-4, IL-6...)

lag krivulja – krivulja bakterijskog rasta u početnoj fazi prilagodbe novim uvjetima

LB – Luria-Broth bujon

MAE – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *microwave-assisted extraction*)

MBC – minimalna baktericidna koncentracija

MDA-MB-231 – stanice humanog karcinoma dojke

MDCK – stanice psećeg bubrega

mg/ml GAE – miligrama galne kiseline u jednom mililitru

MHA – Müller Hintonov agar

MIK – minimalna inhibicijska koncentracija

MRSA – meticilin-rezistentni *S. aureus*

MS – masena spektroskopija (engl. *mass spectroscopy*)

NADES – ekstrakcija prirodnim dubokim eutektičnim otapalima (engl. *natural deep eutetic solvents*)

NF- $\kappa$ B – kappa B – nuklearni čimbenik (engl. *nuclear factor kappa B*)

NK – stanice prirodne ubojice (engl. *natural killer cells*)

NMR – nuklearna magnetna rezonanca (engl. *nuclear magnetic resonance*)

NO – dušikov oksid

NRF2 – nuklearni čimbenik eritroid 2 povezan s čimbenikom 2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

PBP 2a – proteinski receptor 2a koji veže peniciline (engl. *penicillin-binding protein 2a*)

PBS – fiziološka otopina s fosfatnim puferom (engl. *phosphate buffer saline*)

PEG 400 – polietilen glikol 400



PGE<sub>2</sub> – prostaglandin E<sub>2</sub>

PSE – ekstrakcija otapalom pod pritiskom (engl. *pressurized solvent extraction*)

QS – kvorumska svijest (engl. *quorum sensing*)

RNK – ribonukleinska kiselina

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (engl. *reactive oxygen species*)

SARS-CoV-2 – koronavirus 2 povezan s teškim akutnim respiratornim sindromom (engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)

SC-CO<sub>2</sub> – superkritični ugljikov dioksid

SD – standardna devijacija

SFE – ekstrakcija superkritičnim tekućinama (engl. *supercritical fluid extraction*)

SuHV-1 – svinjski herpesvirus tipa 1

TLC – tankoslojna kromatografija (engl. *thin-layer chromatography*)

TLR – *toll-like* receptor

TNF – čimbenik tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor*)

TNF- $\alpha$  – čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$

TVT – transmisivni venerični tumor

UAE – ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *ultrasound-assisted extraction*)

UV – ultraljubičasto zračenje

UV-B – ultraljubičaste B zrake (engl. *ultraviolet B*)

VOCs – hlapljivi organski spojevi (engl. *volatile organic compounds*)

Yac-1 – stanice mišjeg limfoma

$\alpha$ -SMA –  $\alpha$ -aktin glatkih mišića (engl.  *$\alpha$ -smooth muscle actin*)

## POPIS PRILOGA

### Popis tablica:

Tablica 1. Koncentracije markera prema kojima je propolis standardiziran izražene u  $\mu\text{g/g}$ .

Tablica 2. Minimalna inhibicijska koncentracija ekstrakta propolisa za ispitivane mikroorganizme.

### Popis slika:

Slika 1. Kromatogram bezalkoholnog ekstrakta propolisa s vrhovima markera i ostalih aktivnih tvari.

Slika 2. Mikrotitarska pločica korištena za određivanje MIK-a.

Slika 3. Ploče na kojima je određen MIK za gljivicu *C. albicans* (ATCC 10231).

Slika 4. Ploče na kojima je određen MIK za bakteriju *S. aureus* (ATCC 29213).

Slika 5. Ploče na kojima je određen MIK za bakteriju *S. aureus* (ATCC 6538).

Slika 6. Koncentracije proteina u izvanstaničnom matriksu nakon izlaganja bakterije *S. aureus* djelovanju bezalkoholnog ekstrakta propolisa u vremenskim razdobljima 1, 3, 6 i 20 sati nakon izlaganja. Koncentracija proteina je iskazana u  $\mu\text{g/ml}$ . Podaci su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja  $\pm$  SD.

Slika 7. Vremenski prikaz izmjerenih koncentracija proteina u izvanstaničnom matriksu nakon izlaganja bakterije *S. aureus* djelovanju pripravka. Koncentracija proteina je izmjerena 1, 3, 6 i 20 sati nakon izlaganja, a iskazana je u  $\mu\text{g/ml}$ . Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti mjerenja  $\pm$  SD.

Slika 8. Koncentracije dvolančane DNK (dsDNA) u izvanstaničnom matriksu nakon izlaganja bakterije *S. aureus* djelovanju pripravka u vremenskim razdobljima 1, 3, 6 i 20 sati nakon izlaganja. Koncentracije DNK su iskazane u  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Podaci su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja  $\pm$  SD.

Slika 9. Vremenski prikaz izmjerenih koncentracija izvanstanične dvolančane DNK (dsDNA) nakon izlaganja bakterije *S. aureus* djelovanju pripravka. Koncentracije DNK izmjerene su 1, 3, 6 i 20 sati nakon izlaganja, a iskazane su u ng/ $\mu$ l. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti mjerenja  $\pm$  SD.

Slika 10. Prikaz dinamičke interakcije propolisa koncentracije 2xMIK i bakterije *S. aureus*. Broj bakterijskih kolonija je izražen u  $\log_{10}$  CFU/ml, a vrijeme (t) od inokulacije je izraženo u satima (h).

Slika 11. Prikaz dinamičke interakcije propolisa koncentracije 2xMIK i gljivice *C. albicans*. Broj gljivičnih kolonija je izražen u  $\log_{10}$  CFU/ml, a vrijeme (t) od inokulacije je izraženo u satima (h).

# SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
2. Pregled rezultata dosadašnjih istraživanja .....	3
2.1. Vrste propolisa .....	3
2.2. Sastav propolisa i biološki aktivne tvari .....	5
2.2.1. Biljni polifenoli .....	7
2.2.1.1. Flavonoidi .....	7
2.2.1.2. Neflavonoidi .....	10
2.2.2. Benzofenoni .....	12
2.2.3. Hlapljivi spojevi .....	13
2.2.4. Manje zastupljeni elementi i spojevi .....	16
2.3. Metode ekstrakcije .....	19
2.3.1. Maceracija .....	20
2.3.2. Ekstrakcija Soxhletovim instrumentom .....	23
2.3.3. Ultrazvučna ekstrakcija (engl. <i>ultrasound-assisted extraction</i> , UAE) .....	25
2.3.4. Mikrovalna ekstrakcija (engl. <i>microwave-assisted extraction</i> , MAE) .....	26
2.3.5. Ekstrakcija superkritičnim tekućinama (engl. <i>supercritical fluid extraction</i> , SFE) .....	27
2.3.6. Metode ekstrakcije pod visokim tlakom .....	28
2.3.7. Ekstrakcija prirodnim dubokim eutektičnim otapalima (engl. <i>natural deep eutetic solvents</i> , NADES) .....	29
2.3.8. Ekstrakcija čvrstom fazom (engl. <i>solid-phase extraction</i> ) .....	30
2.4. Pregled učinaka propolisa .....	31
2.4.1. Antibakterijski učinak propolisa .....	31
2.4.1.1. Mehanizmi antibakterijskog djelovanja propolisa .....	37
2.4.1.2. Sinergijsko djelovanje propolisa .....	41
2.4.2. Antimikotički učinak propolisa .....	42
2.4.3. Antiparazitski učinak propolisa .....	43
2.4.4. Antivirusni učinak propolisa .....	45
2.4.5. Antioksidacijski učinak propolisa .....	46
2.4.6. Antitumorski učinak propolisa .....	49
2.4.7. Ostali imunosno posredovani učinci propolisa .....	51
3. Materijal i metode .....	57
3.1. Ekstrakcija i standardizacija propolisa .....	57

3.2.	Utvrđivanje i analiza koncentracije aktivnih tvari u propolisu .....	57
3.3.	Mikrobiološki postupci .....	58
3.3.1.	Priprema mikroorganizama za nasađivanje i postupak podešavanja optičke gustoće suspenzije .....	58
3.3.2.	Postupak određivanja antimikrobnog učinka i izračunavanja minimalne inhibicijske koncentracije (MIK).....	59
3.3.3.	Određivanje koncentracije proteina i dvolančane DNK bakterije (engl. <i>double-stranded DNA</i> , dsDNA) <i>S. aureus</i> (ATCC 6538) u izvanstaničnom matriksu .....	60
3.3.4.	Metoda dinamičke procjene antimikrobne aktivnosti propolisa – <i>Time kill kinetics assay</i> .....	60
3.4.	Obrada i grafičko prikazivanje podataka .....	61
4.	Rezultati.....	62
4.1.	Koncentracije aktivnih tvari u propolisu .....	62
4.2.	Minimalna inhibicijska koncentracija (MIK) bezalkoholnog ekstrakta propolisa....	63
4.3.	Koncentracije proteina i dsDNA u izvanstaničnom matriksu .....	66
4.4.	<i>Time-kill</i> krivulja .....	70
5.	Rasprava .....	72
6.	Zaključci .....	79
7.	Literatura .....	80
8.	Sažetak.....	112
9.	Summary.....	113
10.	Životopis.....	114

## 1. UVOD

Propolis je prirodni smolasti pčelinji proizvod koji nastaje prikupljanjem raznih eksudata biljaka koji se zatim miješaju s voskom i pčelinjim enzimima. Riječ „propolis“ dolazi iz grčkog jezika, a njezin prijevod slikovito opisuje ulogu propolisa u košnici te znači „na ulazu u grad/zajednicu“ (BANKOVA i sur., 2000.). Pčele propolisom oblažu površine košnice, a koriste ga i za popunjavanje pukotina te oblaganje većih ubijenih nametnika i štetnika. Tako propolis sudjeluje u zaštiti i održavanju higijene košnice te u obrani od bolesti (CRANE, 1990.). Osim pčelama propolis je i ljudima poznat više od dvije tisuće godina. Dokazi o korištenju propolisa u liječenju pronađeni su u staroj Grčkoj gdje je balzam od propolisa Hipokrat 400 pr. Kr. propisivao pacijentima za liječenje rana i ulkusa (GHISALBERTI, 1979.).

Kemijski sastav propolisa je raznolik i ovisi o biljnim i geografskim obilježjima staništa na kojem ga pčele skupljaju. Pod utjecajem klime i geografskog smještaja, u staništima se nalaze brojne biljne vrste iz kojih se dobivaju propolisi različitog izgleda i sastava (SANTOS i sur., 2020.; POPOVA i sur., 2019.). Osim geografskih obilježja i genetika pčele utječe na sastav sirovog propolisa (BARTH i LUZ, 2003.). Zbog navedenog postoji potreba njegove standardizacije, odnosno pronalaženja sustava kojim bi se okarakterizirao. Neke od predloženih standardizacija su standardizacija prema botaničkom podrijetlu i standardizacija određivanjem markera, odnosno mjerljivih pokazatelja (BANKOVA, 2005.; POPOVA i sur., 2007.). Marker biološke aktivnosti su prema istraživanjima odgovorni za većinu učinaka propolisa, a najčešći su biljni polifenoli, odnosno sekundarni metaboliti pronađeni u raznim biljkama i proizvodima biljnog podrijetla (CUSHNIE i LAMB, 2005.). Među biljnim polifenolima ističu se flavonoidi, a od ostalih aktivnih tvari se u propolisu mogu naći i neflavonoidi, benzofenoni, hlapljivi spojevi i drugi manje zastupljeni elementi (CHIRUMBOLO, 2011.; WALKER i CRANE, 1987.). Na konačan učinak propolisa utječe i odabrana metoda njegove ekstrakcije (WOŹNIAK i sur., 2020.). Zbog jednostavnosti, dostupnosti i niske cijene se za ekstrakciju propolisa najčešće koriste alkoholi, no u zadnje vrijeme znanstvenici ustraju u pronalaženju novih alternativnih i ekološki prihvatljivijih metoda (AZWANIDA, 2015.).

Do danas su dokazana brojna biološka i farmakološka svojstva propolisa među kojima su njegovi izravni antibakterijski, antimikotički, antiparazitni i antivirusni učinci (SILVA i sur., 2017.). Također, propolis djeluje i na stanice te posljedično i na razna tkiva antioksidacijskim,

antitumorskim, protuupalnim i ostalim imunosno posredovanim mehanizmima (GHISALBERTI, 1979.; BURDOCK, 1998.; SFORCIN, 2016.). Iako su do danas otkriveni brojni mehanizmi, još je puno neotkrivenih činjenica vezanih uz ovu prirodnu mješavinu aktivnih tvari. Također, u najvećem se broju istraživanja koriste alkoholni (etanolni) ekstrakti propolisa pa su zaključci vezani uz druge vrste ekstrakata oskudni (TAKAISI-KIKUNI i SCHILCHER, 1994.). Alkohol je najčešće i vrlo dobro otapalo, ali nije prikladno za primjenu kod svih pacijenata i kod određenih stanja u humanoj i veterinarskoj medicini. Zbog specifičnosti fiziologije trudnica, dojilja i djece, nagrizajućeg djelovanja na neka tkiva i neprikladnosti primjene kod životinja i ovisnika, potrebno je pronaći nova sigurnija otapala i nove jednako djelotvorne metode ekstrakcije (KUBILIENE i sur., 2018.; ŠURAN i sur., 2021a.).

Antibakterijska svojstva propolisa su danas posebno značajna zbog porasta rezistencije na antibiotike i potrebe za pronalaženjem novih prirodnih antimikrobnih pripravaka (DURAND i sur., 2018.; GHOSH i sur., 2020.). Znanstvenici se u borbi protiv mikroorganizama sve više oslanjaju na primjenu prirodnih proizvoda kao što je propolis (SFORCIN i BANKOVA, 2011.). U dosadašnjim istraživanjima su osim potvrde antibakterijskog djelovanja propolisa predloženi i neki od potencijalnih mehanizama djelovanja. Najčešće istraživani mehanizmi uključuju povećanje permeabilnosti i mijenjanje potencijala stanične membrane bakterije, smanjenje proizvodnje ATP-a, smanjenje bakterijske pokretljivosti, inhibiciju enzima uključenih u bakterijsku proliferaciju te aktivaciju tjelesne stanične i humoralne imunosti u borbi protiv patogenih mikroorganizama (MIRZOEVA i sur., 1997.; PRZYBYŁEK i KARPIŃSKI, 2019.). Nedostatak ovih istraživanja je također vezan uz korištenje alkoholnih ekstrakata.

Potaknuti navedenim ograničenjima odlučili smo ispitati antibakterijske mehanizme bezalkoholnog ekstrakta propolisa. U ovom istraživanju je korišten patentirani i standardizirani ekstrakt propolisa dobiven maceracijom u neškodljivom otapalu od polietilenglikola i lecitina (RADIĆ i sur., 2020.). Nizom *in vitro* pokusa pokušali smo potvrditi antibakterijsko i antimikotičko djelovanje ispitivanog ekstrakta i otkriti potencijalne mehanizme djelovanja bezalkoholnog propolisa na bakterijsku staničnu membranu i bakterijsku stijenku.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Vrste propolisa

Diljem svijeta propolis nije jedinstvena mješavina aktivnih tvari, stoga ga je vrlo teško jednostavno okarakterizirati. Ipak odrednice kao što su sezonalnost i godišnje doba u kojem je prikupljen, geografska obilježja nalazišta, biljne vrste podrijetla, genetika pčela i koncentracija aktivnih tvari dopuštaju nam da na temelju objektivnih činjenica propolis sličnih obilježja nazivamo zajedničkim imenom (KUJUMGIEV i sur., 1999.; BANKOVA, 2005.; SANTOS i sur., 2020.; POPOVA i sur., 2019.).

Pčele propolis prikupljaju u razdoblju najveće aktivnosti pčelinjih zajednica koje je različito i ovisi o klimatskim prilikama u pojedinim dijelovima svijeta. Prema GHISALBERTIJU (1979.) i KÖNIGU (1985.) na europskom području glavna sezona prikupljanja propolisa seže od proljeća na mediteranskom području do sredine ljeta u sjevernoj i srednjoj Europi. Na području Sjeverne Amerike se kasno ljeto, pa i jesen, smatraju glavnim razdobljima za ovu pčelinju aktivnost. Pod utjecajem optimalne atmosferske temperature smole biljaka omekšaju te postaju podatnije za manipulaciju usnim aparatom pčela. Vjeruje se da je prisutnost toplijeg vremena vrlo bitan čimbenik za određivanje razdoblja prikupljanja propolisa. Pčele koje žive u tropskim krajevima, kao što su pčele na području Brazila skupljaju propolis tijekom cijele godine. Analizom je utvrđeno da su razlike u propolisu koji je prikupljan na istom području u različito doba godine vrlo malene (BANKOVA i sur., 1998b.).

Prema botaničkom podrijetlu i rasprostranjenosti propolis je podijeljen na tri glavne skupine koje uključuju europski propolis, zeleni propolis i crveni propolis (BOBIŠ, 2022.). Europski propolis u literaturi možemo pronaći i pod nazivom topola tip koji nastaje prikupljanjem smole pupoljaka različitih vrsta topole (*Populus* spp.) među kojima je najčešća vrsta *Populus nigra* L. te je to ujedno i farmakološki najviše proučavan (BANKOVA, 2005.; POPOVA i sur., 2007.). Topola tip propolisa rasprostranjen je na području umjerene klime Europe i Sjeverne Amerike, u dijelovima Azije u kojima ne vlada tropska klima, na Novom Zelandu (BANKOVA i sur., 2000.) te na dijelovima sjeveroistočne Afrike (HEGAZI i EL HADY, 2001.). Doprinos botaničkom profilu europskog propolisa uz prisustvo različitih vrsta topole (*P. nigra*, *P. alba*, *P. tremula*) daju i sekundarne biljne vrste kao što su *Quercus* spp., *Acacia* spp., *Ulmus* spp., *Picea* spp., *Fraxinus* spp., *Pinus* spp., *Alnus glutinosa*, *Betula*



*pendula*, *Salix alba* i *Aesculus hippocastanum* (BANKOVA i sur., 2000.; SALATINO i sur., 2005.; RISTIVOJEVIĆ i sur., 2015.; MÄRGHITAŞ i sur., 2013.). Zeleni brazilski propolis nastaje prikupljanjem smole lišća biljaka vrste *Baccharis* spp. i to dominantno *B. dracunculifolia* DC. (MOISE i BOBIŞ, 2020.). Vegetativni pupoljci i listovi mladih biljaka bogati su klorofilom koji je zaslužan za zelenu boju ovog propolisa (SALATINO i sur., 2005.). Propolis crvene boje može biti kubanski (venezuelanski) crveni propolis koji nastaje prikupljanjem cvjetnih smola biljaka iz roda *Clusia* ili brazilski crveni propolis koji nastaje prikupljanjem smole s površine oštećenja kore u granama biljke *Dalbergia ecastophyllum* L. nastalih bušenjem nametničkih kukaca te biljke (CUESTA-RUBIO i sur., 2002.; MOISE i BOBIŞ, 2020.; DAUGSCH i sur., 2008.). Kubanski propolis osim na crveni možemo podijeliti i na smeđi i žuti propolis, ovisno o udjelu sekundarnih biljnih metabolita (PICCINELLI i sur., 2011.).

Osim prethodnih vrsta propolisa u literaturi se najčešće spominju brezin ruski propolis u kojem je najzastupljenija smola breze *Betula verrucosa* Ehrh. (POPRAVKO, 1978.; BANKOVA, 2005.; SFORCIN i BANKOVA, 2011.), mediteranski propolis od smole biljaka iz porodica čempresa (Cupressaceae) i borova (Pinaceae) (POPOVA i sur., 2009.; POPOVA i sur., 2010.; POPOVA i sur., 2011.; MELLIU i CHINOU, 2004.) te tihooceanski propolis prikupljen od biljke *Macaranga tanarius* L. (CHEN i sur., 2008.; KUMAZAWA i sur., 2008.). Navedene vrste propolisa prikupljaju medonosne pčele vrste *Apis mellifera*.

Uz medonosne pčele, i druge vrste pčela prikupljaju i skladište propolis. U literaturi se najčešće spominje propolis pčela iz roda *Melipona* koje imaju rudimentaran žalac koji ne koriste u obrani nego brane svoje košnice ugrizom (ROUBIK i sur., 1987.; POPOVA i sur. 2019.). Kako bi se razdvojio propolis bezžalčanih pčela od ostalih vrsta propolisa u literaturi se često nalaze nazivi kao što su cerumen ili geopropolis. Naziv geopropolis dolazi od činjenice da neke vrste *Melipona* pčela u stvaranju propolisa smolama biljaka dodaju vosak, ali i zemljane materijale poput gline i tla, uz biljne trihome – izrasline na površini biljaka podrijetlom od epidermalnih stanica (BARTH i LUZ, 2003.; HÜLSKAMP, 2004.). Prisutnost zemljanih materijala u propolisu ovog roda pčela nije pravilo pa se naziv geopropolis ne bi trebao koristiti kao sinonim za propolis pčela roda *Melipona* (ÇELEMLI, 2013.; POPOVA i sur., 2019.). Istraživanje BARTHA i LUZA (2003.) dokazalo je zastupljenost peludi raznih biljnih vrsta u brazilskom geopropolisu, a najučestalije su bile biljne vrste iz rodova *Eucalyptus*, *Schinus* i *Myrcia*. Nadalje, zaključili su da pčele roda *Melipona* posjećuju puno

više vrsta biljaka od pčela roda *Apis* koje su uže specijalizirane pa se propolis jedne košnice rijetko sastoji od smole više od tri dominantne biljne vrste (ISIDOROV i sur., 2016.).

Nažalost, samo podrijetlo propolisa ne može biti dovoljno objektivni kriterij za njegovu standardizaciju pa je BANKOVA (2005.) predložila da se botaničko podrijetlo uz neizostavnu zastupljenost i koncentracije aktivnih tvari koristi pri objektivnom obilježavanju propolisa. Objektivna karakterizacija ove prirodne mješavine aktivnih tvari otvara vrata široj i kvalitetnijoj primjeni propolisa za izradu ljudskih i veterinarskih pripravaka.

## 2.2. Sastav propolisa i biološki aktivne tvari

Stoljećima je poznata ljekovitost propolisa, no njezin uzrok bio je skriven sve do pojave modernijih analitičkih metoda. Razvoj metoda kao što su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC), tankoslojna kromatografija (engl. *thin-layer chromatography*, TLC), plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC), masena spektroskopija (engl. *mass spectroscopy*, MS), nuklearna magnetna rezonanca (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR) i kombinacije navedenih metoda omogućio je znanstvenicima detaljnije istraživanje biokemijskog profila prirodnih mješavina (CUESTA-RUBIO i sur., 2002.; MARKHAM i sur., 1996.; CHIMSHIROVA i sur., 2022.; DUDOIT i sur., 2020.). Za široki raspon aktivnosti propolisa odgovorne su mjerljive biološki aktivne tvari. Najčešće su to sekundarni metaboliti biljaka od kojih je propolis nastao pa je do danas u analiziranim uzorcima različitih vrsta propolisa pronađeno preko 500 poznatih spojeva iz različitih skupina (HUANG i sur., 2014.).

Sirovi propolis se sastoji od biljnih smola (50 %), voska (30 %), esencijalnih i aromatičnih ulja (10 %), peludi (5 %) i ostalih organskih tvari (5 %) (BURDOCK, 1998.). Također, iz poznate literature su procijenjene količine hranjivih tvari u propolisu pa 100 grama propolisa sadrži 1 gram proteina, 1 gram ugljikohidrata i 1 gram masti što su beznačajne količine uzevši preporučeni dnevni unos propolisa od 200 miligrama u obzir (BOGDANOV, 2014.).

Iako se zbog kontakta s probavnim izlučevinama pčele propolis smatra proizvodom animalnog podrijetla (ŠURAN i sur., 2021a.) glavna aktivna tvar se podudara s aktivnim tvarima pronađenim u biljkama. Najčešće je riječ o metabolitima biljaka, odnosno proizvodima

njihovog primarnog i sekundarnog metabolizma. Primarni metaboliti biljaka su neophodni za biljnu stanicu te njezin rast i razvoj, a uključuju spojeve kao što su aminokiseline, jednostavni šećeri, nukleinske kiseline i lipidi. Sekundarni metaboliti nisu neophodni za život biljaka, no one ih proizvode odgovarajući na stresne čimbenike i u svrhu obrane. Među sekundarnim metabolitima biljaka možemo pronaći spojeve kao što su fenoli, terpeni i alkaloidi odnosno spojevi koji sadržavaju dušik (KEELING i BOHLMANN, 2006.; ZWENGER i BASU, 2008.; ERB i KLIEBENSTEIN, 2020.).

Prema CRANE (1990.) pčele prikupljaju tvari koje biljke aktivno izlučuju ili se na njima mogu pronaći nakon oštećenja u obliku smolaste supstance. S obzirom na to da je zadaća ovih biljnih izlučevina obrana biljke od vanjskih utjecaja, ne čudi da pčelama one služe za izradu propolisa koji ima sličnu ulogu u obrani pčelinjih zajednica. U pčelinjem okolišu se nalazi mnoštvo biljnih vrsta, no samo smola nekolicine vrsta služi kao izvor za stvaranje propolisa stoga se smatra da su sastavnice biljnih eksudata – terpeni, terpenoidi i polifenoli – atraktanti koji privlače pčele određenim vrstama biljaka (ISIDOROV i sur., 2016.). Analizirajući zaključke drugih autora o razlozima prikupljanja propolisa GHISALBERTI (1979.) je zaključio da su nepovoljni uvjeti u okolišu, poput loših higijenskih uvjeta i prisustva predatorskih kukaca, glavni okidač za prikupljanje propolisa. S obzirom na to da je riječ o esencijalnom ponašanju pčela, one u nedostatku primjerenih biljnih vrsta posežu za tzv. zamjenama za propolis kao što su razne boje, bitumen i mineralna ulja što može ugroziti njegovu biološku čistoću (KÖNIG, 1985.; BANKOVA i sur., 2000.).

Na udio i prisutnost pojedinih aktivnih tvari u propolisu utječu brojni ranije navedeni čimbenici pa je analiza uzoraka različitih biljnih profila i geografskih nalazišta potvrdila određene razlike u sastavu. Sastav propolisa s različitih geografskih nalazišta se razlikuje kao što se razlikuje kemijski sastav dviju biljaka iz različitih biljnih porodica pa je potrebno pronaći sustav standardizacije koji bi osiguravao kvalitetu, učinkovitost i sigurnost pri upotrebi (BANKOVA, 2005.). Sljedeće kemijske skupine spojeva se mogu pronaći u propolisu: polifenoli (posebice flavonoidi, lignan i fenolne kiseline), njihovi derivati, esteri i aromatski spojevi, aciklički, ciklički ugljikovodici (npr. aromatski kao što su terpeni) i heteroaromatski ugljikovodici, alkohol, ketoni i aldehidi, šećeri, aminokiseline, masne kiseline i mineralni elementi (WALKER i CRANE, 1987.; IVANČAJIĆ i sur., 2010.; HUANG i sur., 2014.; WAGH, 2013.). Važno je napomenuti da koncentracije spojeva različitih vrsta ekstrakata istog propolisa mogu biti promjenjive zbog različitih svojstava i obilježja otapala i metoda ekstrakcije (WOŹNIAK i sur., 2020.).

U istraživanju KUJUMGIEVOG i suradnika (1999.) dokazana je slična razina biološke aktivnosti uzoraka propolisa s različitih geografskih nalazišta, iako se njihov kemijski sastav i omjer aktivnih tvari razlikovao. Navedeno istraživanje potkrepljuje tvrdnju da za biološku aktivnost propolisa nije odgovorna zastupljenost određenog spoja nego je ona rezultat kompleksnog međudjelovanja više različitih spojeva. Također, aktivnosti pojedinih aktivnih tvari izoliranih iz propolisa nikada nije nadmašila aktivnost cjelovitog ekstrakta (BONVEHI i sur., 1994.; KUJUMGIEV i sur., 1999.).

### 2.2.1. Biljni polifenoli

Biljke proizvode polifenole koji se dijele na nekoliko skupina prema razlici u njihovoj kemijskoj strukturi, a glavne su flavonoidi i neflavonoidi među kojima su fenolne kiseline, lignani i stilbeni (DAGLIA, 2012.; RANA i sur., 2022.). S obzirom na to da su i fenolne kiseline i flavonoidi polifenolni derivati fenilalanina i šikiminske kiseline njihovo djelovanje se često isprepliće. Ovisno o dozi, stabilnosti u ekstraktu i molekulskim obilježjima međudjelovanje ovih spojeva može biti sinergijsko ili kompetitivno (CHIRUMBOLO, 2011.). Ovu tvrdnju potvrđuje istraživanje djelovanja uzoraka brazilskog i kineskog propolisa na degranulaciju mastocita. Brazilski propolis je, unatoč većoj koncentraciji flavonoida, pokazao slabiji učinak od kineskog pa sama zastupljenost polifenola u propolisu nije jedini pokazatelj aktivnosti (NAKAMURA i sur., 2010.). Također, uočeni su i primjeri sinergizma između polifenolnih molekula pa je tako u propolisu topola tipa flavonol kvercetin uz fenolne kiseline kavenu kiselinu i fenil ester kavene kiseline (engl. *caffeic acid phenethyl ester*, CAPE) uzrokovao smanjenje broja tumorskih čvorića u plućima te je uočen puno bolji zajednički učinak ovih molekula pri primjeni propolisa nego kada je svaka od njih analizirana zasebno (ORŠOLIĆ i sur., 2004.).

#### 2.2.1.1. Flavonoidi

Flavonoidi su, kao sekundarni metaboliti biljaka, najzastupljenija skupina polifenola u propolisu. U različitim dijelovima biljke imaju drukčije uloge pa je tako uloga flavonoida u cvjetovima osiguravanje boje atraktivne oprašivačima (CUSHNIE i LAMB, 2005.). Listove flavonoidi zaštićuju od UV-B zračenja, a između ostaloga sudjeluju i u osjetljivosti biljke na

svjetlo, transportu energije, radu hormona i regulatora rasta (HARBORNE i WILLIAMS, 2000.). Osim u navedenim dijelovima biljke pronalazimo ih u propolisu, voću, povrću i u nekim pićima. Temelj za njihovu daljnju podjelu je pozicija atoma ugljika na koju je vezan dodatni prsten te stupanj nezasićenosti i oksidacije osnovnog prstena. Oni flavonoidi kojima je dodatni prsten vezan za ugljik na trećoj poziciji osnovnog prstena nazivaju se izoflavonoidi, a oni kojima je vezan za četvrtu poziciju nazivaju se neoflavonoidi. Spojevi kod kojih je dodatni prsten vezan za ugljik na drugoj poziciji se mogu podijeliti prema strukturalnim značajkama osnovnog prstena na flavone, flavonole, flavanone, flavanonole, flavanole ili katehine, antocijane i kalkone (PANCHE i sur., 2016.).

Analizom uzoraka propolisa topola tipa s hrvatskog tržišta KOSTALEC i suradnici (2005.) utvrdili su da je sadržaj flavona i flavonola u uzorcima bio relativno stalan te se kretao između 0,14 % i 0,41 %, no koncentracije flavanona su varirale od 0,43 % do 18,78 %. Ukupne količine flavonoida kretale su se između 0,78 % i 18,92 %, a većina proizvoda je imala sadržaj flavonoida ispod 9 %. Zanimljivo je da su svi uzorci koji su imali ukupni udio flavonoida veći od 1 % pokazali antimikrobno djelovanje prema bakterijama *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* i gljivici *Candida albicans*. Među češće spominjanim flavonoidima u propolisu topola tipa su krisin, galangin, kvercetin, kampferol, pinocembrin i pinobaksin-3O-acetat (SFORCIN i BANKOVA, 2011.; PELLATI i sur., 2013.; WOŹNIAK i sur., 2020.). Flavon krisin ima nešto manju antimikrobnu aktivnost, no najčešće mu se pripisuju zaštitna uloga organskih sustava, antioksidacijski, protuupalni i antitumorski učinak. Flavonol galangin ima ulogu u supresiji upale, antiproliferativni i antibakterijski učinak, a flavanon pinocembrin preko brojnih mehanizama ima najviše izražen antioksidacijski učinak (ŠURAN i sur. 2021a.). WANG i suradnici (2018.) ispitivali su protuupalnu, antioksidacijsku i antitumorsku aktivnost flavonola kampferola i njegovih glikozida *in vitro* na stanice ljudskog hepatocelularnog karcinoma (HepG2), mišjeg karcinoma debelog crijeva (CT26) i mišjeg melanoma (B16F1). Kampferol je na navedene stanice djelovao antiproliferacijski, potaknuo je aktivnost uklanjanja slobodnih radikala i smanjio je proliferaciju aktiviranih T-limfocita. Druga skupina autora, AMOROS i suradnici (1992.), istraživala je antivirusno djelovanje flavanona i flavonola. Prema rezultatima su flavonoli bili učinkovitiji u smanjivanju virusnog titra, a među njima su kampferol, galangin i kvercetin imali najbolje samostalno djelovanje. Uspoređujući ova tri flavonola uočeno je smanjivanje antivirusnog djelovanja s povećanjem broja hidroksilnih skupina u spoju, točnije najbolje djelovanje pokazao je galangin, nešto slabije kampferol, a najslabije kvercetin. Flavonol s

najmanjim brojem hidroksilnih skupina je najlipofilniji što mu omogućava lakši prolaz kroz lipidne barijere virusa i posljedično njegovo najbolje djelovanje (CHENG i WONG, 1996.). Neki od ostalih flavonoida koji su rjeđe kvantificirani u propolisu topola tipa su: apigenin, rutin, miricetin, luteolin, naringenin, i pinostrobin (GATEA i sur., 2015.; WOŹNIAK i sur., 2020.; NICHITOI i sur., 2021.). Uzevši u obzir povezanost između botaničkog podrijetla, biološke aktivnosti i koncentracije aktivnih tvari BANKOVA (2005.) je predložila da bi se pri standardizaciji topola tipa propolisa trebao odrediti ukupan sadržaj flavona i flavonola, ukupne flavanone i dihidroflavonole te ukupni sadržaj fenola u propolisu koristeći spektrofotometrijske metode.

Osim topola tipa propolisa i druge vrste propolisa također sadrže neke vrste flavonoida pa tako tihooceanski propolis sadrži desetak preniliranih flavanona jakog antimikrobnog učinka. Zbog lipofilne prenilirane skupine oni vrlo lako prolaze kroz stanične membrane te narušavaju funkcije bakterijske stanice (RAGHUKUMAR i sur., 2010.). Nekoliko autora istraživalo je kemijski profil brazilskog crvenog propolisa te su u uzorcima najčešće izolirali izoflavonoide. Izoflavonoidi su biljni metaboliti podijeljeni na više podskupina među kojima su izoflavoni, izoflavani, pterokarpani i kumestani (INGHAM, 1983.; SIMONS i sur., 2012.). DAUGSCH i suradnici (2008.) su od izoflavona izolirali biokanin A, formononetin i daidzein, a RUFATTO i suradnici (2018.) biokanin A, formononetin i likviritigenin. Rasprostranjenost izoflavonoida među biljnim vrstama nije široka pa ih je tako moguće izolirati gotovo isključivo iz biljaka porodice Leguminosae kao što su soja, slanutak i leća. Biljna vrsta *D. ecastophyllum* također je dio porodice leguminoza, a i najzastupljenija biljna vrsta u brazilskom crvenom propolisu (INGHAM, 1983.; DAUGSCH i sur., 2008.). Struktura izoflavonoida biljaka je vrlo slična strukturi estrogena sisavaca pa se uz još neke spojeve kao što su lignani, stilbeni i kumestani često se nazivaju i fitoestrogeni. Zbog svog djelovanja mogu potaknuti smanjenje osteoporoze, kardiovaskularnih bolesti, prevenirati karcinom i umanjiti simptome menopauze, no i štetno djelovati na spolni sustav (SHARMA i RAMAWAT, 2013.; WOCLAWEK-POTOCKA i sur., 2013.). Osim iz brazilskog crvenog propolisa, izoflavonoidi su izolirani i iz uzoraka kubanskog crvenog propolisa i to dva izoflavona, tri izoflavana i šest pterokarpana (PICCINELLI i sur., 2005.). Brazilski zeleni propolis također sadrži flavonoide, no ne u velikim količinama (SALATINO i sur., 2005.; FERNANDES-SILVA i sur., 2013.), kenijski propolis sadrži vrlo specifične flavonoide poput makarangina (PETROVA i sur., 2010.), a i ruski brezin propolis sadrži različite flavonoide od flavonoida koje možemo pronaći u propolisu topola tipa (POPRAVKO, 1978.). Tekućinskom kromatografijom visoke

djelotvornosti (HPLC) analizirani su uzorci propolisa iz moskovske regije te su uz pinocembrin i pinostorbin koji se nalazi i u topola tipu propolisa izolirani i sljedeći flavonoidi: akacetin, izalpinin, tektokrisin i kumatokilin (FEDOTOVA i KONOVALOV, 2019.). Bez obzira na navedeno, ne sadrže sve vrste propolisa flavonoide. Navedenu tvrdnju potvrđuje istraživanje DA CUNHE i suradnika (2013.). Autori su istraživali geopropolis pčelinje vrste *Melipona scutellaris* te su kemijskom analizom potvrdili odsutnost flavonoidnih tvari u ovoj vrsti propolisa, iako je ovaj propolis pokazao dobro antibakterijsko djelovanje na *Streptococcus mutans* i *S. aureus*. Također, ni uzorci propolisa s Kanarskih otoka nisu sadržavali uobičajene fenole (BANKOVA i sur., 1998b.).

#### 2.2.1.2. Neflavonoidi

Neflavonoidi su bitna skupina polifenolnih spojeva pronađenih u propolisu. U radovima koji se bave kemijskim sastavom propolisa često su navedene fenolne kiseline (cinamična i benzojeva kiselina) i njihovi derivati. Derivati cinamične kiseline kao što su kavena, p-kumarinska i ferulična kiselina, a i njihovi esteri (posebice fenil ester kavene kiseline, CAPE) imaju vrlo bitno mjesto u istraživanju aktivnih molekula propolisa (ANSORGE i sur. 2003.; SFORCIN i BANKOVA, 2011.). Fenil ester kavene kiseline (CAPE) je jedna od najistraživanijih molekula propolisa topola tipa (PELLATI i sur., 2013.). Od ostalih fenolnih kiselina spominju se benzojeva i hidroksibenzojeva kiselina koje su prekursor za nastanak protokatehinske, elagične i galne kiseline (WALKER i CRANE, 1987.; DAGLIA, 2012.; ŠURAN i sur., 2021a.) te siringična i vanilinska kiselina (WOŽNIAK i sur., 2020.).

Neke od navedenih molekula su prekursori ili su uključene u druge skupine spojeva kao što su tanini i fenilpropanoidi. Navedene skupine spojeva su prisutne u različitim tipovima propolisa. Tanini su polifenoli koji imaju svojstvo povezivanja s proteinima u stabilne komplekse te su im pripisana antibakterijska, antiparazitska, antioksidacijska, antialergijska i protuupalna svojstva (WEI i sur., 2012.; HOSTE i sur. 2012.). Dije se na dvije skupine molekula: hidrolizirajuće i kondenzirane tanine. Hidrolizirajući tanini su elagična i galna kiselina, a kondenzirani se tanini nazivaju proantocijanidini (BERNAYS i sur., 1989.). Hidrolizirajući tanini poput elagične i galne kiseline su glavni spojevi iz skupine polifenola koji su redovito pronađeni u geopropolisu pčela roda *Melipona* s naglašenom antioksidacijskom aktivnošću (BATISTA i sur., 2016.). Nadalje, MAYWORMA i suradnike

(2014.) je nedostatak znanstvenih radova o kondenziranim taninima u propolisu potaknuo na istraživanje. Istraživali su prisutnost kondenziranih tanina u etanolnim ekstraktima brazilskog zelenog, smeđeg i crvenog propolisa. U svim uzorcima su utvrdili tanine, a najveći udio tanina (4,1 %) imao je brazilski crveni propolis. Također, uvidjeli su pozitivnu korelaciju između ukupne količine fenola i tanina u uzorcima. S obzirom na navedeno predložili su da bi se udio tanina u propolisu trebao uzeti u obzir pri standardizaciji propolisa uz ranije predloženu ukupnu koncentraciju fenola i flavonoida (DA SILVA i sur., 2006.). Fenilpropanoidi su također sekundarni metaboliti biljaka, s brojnim učincima, sintetizirani od aminokiselina fenilalanina i tirozina. Dvije ishodišne molekule i predstavnici glavnih skupina fenilpropanoida su hidroksicinamična i hidroksibenzojeva kiselina (NEELAM i SHARMA, 2020.), a u brazilskom zelenom propolisu prevladavaju prenilirani fenilpropanoidi kao što su derivati cinamične kiseline i artemilin C, derivat p-kumarinske kiseline drupanin te derivati kavene kiseline (KUMAZAWA i sur., 2003.; SALATINO i sur., 2011.; FERNANDES-SILVA i sur., 2013.). Prenilirani fenilpropanoidi pronađeni su i u uzorcima propolisa pčela roda *Melipona* što je vjerojatno povezano uz njihove koncentracije u biljkama roda *Eucalyptus* (DOS SANTOS i sur., 2017.; RASHWAN, 2002.). Kumarini su derivati nastali spajanjem benzena i  $\alpha$ -pironskog prstena, a podijeljeni su u tri podskupine: jednostavni kumarini, piranokumarini i furanokumarini. Najpoznatiji su po svom antikoagulacijskom djelovanju, a djeluju i citostatički, antimikotički, protuupalno i spazmolitički (HOULT i PAYÁ, 1996.). U propolisu su najčešće pronađeni jednostavni kumarini pa su iz uzoraka slovačkog propolisa izolirani eskulin, dafnetin, fraksetin, umbeliferon, 4-metilumbeliferon, 4-hidroksikumarin, skoparon, kumarin i hernijarin, a Iranski propolis sadrži prirodni prenilirani kumarin suberosin (HROBOŇOVÁ i sur., 2013.; TRUSHEVA i sur., 2010.).

Stilbeni su maleni biljni polifenoli sintetizirani sličnim putevima kao i fenilpropanoidi. Nalaze se u strukturi biljnih organa ili su sintetizirani kao sekundarni metaboliti u odgovoru na stresne čimbenike iz okoline (kukce, patogene mikroorganizme i UV zračenja), a tada ih se naziva fitoaleksinima. Osim što ograničavaju djelovanje patogenih mikroorganizama na biljke pokazuju i protuupalna, antioksidacijska i antitumorska svojstva (ROUPE i sur., 2006.). Većina biljaka može sintetizirati prekursore za njihov nastanak, no gotovi stilbeni nisu toliko često izolirani pa ih možemo naći u biljkama iz porodice Leguminosae, Myrtaceae, Moraceae, Polygonaceae, Pinaceae i Liliaceae (ERDTMAN, 1963.). U skladu s rijetkim pojavljivanjem stilbena u biljnom svijetu, nisu često izolirani iz propolisa. PETROVA i suradnici (2010.) imali su priliku istraživati rijetko dostupne uzorke propolisa iz Kenije. S obzirom na prisutnost



različitih resursa za stvaranje propolisa, kao što je biljka *Macaranga schweinfurthii* iz roda *Macaranga*, očekivano su izolirani drukčiji spojevi poput stilbena švainfurtina A i švainfurtina B koji se ne nalaze u često istraživanim tipovima propolisa. Također, ABU-MELLAL i suradnici (2012.) su iz australskog propolisa izolirali 12 vrsta stilbena među kojima je šest preniliranih stilbena, a spomenuli su i neke ranije istraživane stilbene poput pinosilvina, pterostilbena i resveratrola. Istraživani australski propolis pokazao je bolju antioksidacijsku aktivnost u usporedbi s brazilskim zelenim propolisom.

Lignani i neolignani su malene polifenolne molekule široko rasprostranjene u biljnom svijetu. Oni potječu od derivata cinamične kiseline, pripadaju biokemijskom putu fenilalanina i najčešće se sastoje od dviju ili više fenilpropanoidnih jedinica. Iako ih se strukturalno može podijeliti u osam skupina, furanski i furofuranski lignani su najzanimljiviji istraživačima propolisa. Zbog raznolikosti spojeva unutar ove skupine, često su istraživana njihova antitumorska, antioksidacijska, antibakterijska, antivirusna, imunosupresivna i antiasmatska svojstva (TEPONNO i sur., 2016., CUI i sur., 2020.). U literaturi se lignani spominju od 1996. godine kada su autori analizom brazilskog propolisa prvi puta izolirali jedan benzofuranski lignan (BANKOVA i sur., 1996.). Nakon toga su furofuranski lignani episesamin i metil ksantoksilol izolirani i iz uzoraka propolisa s Kanarskih otoka uz još 11 molekula lignanske strukture (BANKOVA i sur., 1998a.). Izolirani spojevi su samostalno pokazali slabu antibakterijsku učinkovitost, ali se učinkovitost cijelog ekstrakta kanarskog propolisa nije razlikovala od učinkovitosti propolisa drugog tipa (CHRISTOV i sur., 1999.). Osim u uzorcima navedenih nalazišta, lignani su još pronađeni u uzorcima propolisa iz Kenije (dva novo izolirana spoja iz skupine arinaftalenskih lignana) i u uzorcima propolisa iz Čilea (tri poznata i dva novo izolirana lignana) (PETROVA i sur., 2010.; VALCIC i sur., 1998.). Premda biljne vrste čiji su oni sekundarni metaboliti i dalje nisu utvrđene, lignani su karakteristična skupina spojeva za propolis tropskog klimatskog pojasa što potvrđuju navedena istraživanja.

### 2.2.2. Benzofenoni

Tropske vrste biljaka, kao što su biljke iz porodice Clusiaceae od kojih se dobiva kubanski crveni propolis, bogate su drugim vrstama biljnih sekundarnih metabolita kao što su poliizoprenilirani benzofenoni. CUESTA-RUBIO i suradnici (2002.) su ispitivali prisutnost poliizopreniliranih benzofenona u uzorcima kubanskog crvenog propolisa. Izolacijom i HPLC

analizom su utvrdili da je benzofenon nemoroson bio većinski utvrđen u uzorcima, a pokazao je i antioksidacijska svojstva. Osim u kubanskom crvenom propolisu, poliizoprenilirani benzofenoni su glavni sekundarni metaboliti pronađeni i u kubanskom smeđem propolisu (PICCINELLI i sur., 2011.), a nalaze se i u propolisu pčela roda *Melipona* (DA CUNHA i sur., 2013.). Prema LIU i suradnicima (2003.) ishodišna molekula za sintezu benzofenona u biljkama je L-fenilalanin od koje se preko cinamične kiseline i benzoil koenzima A (benzoil-CoA) uz enzim benzofenon sintetazu formiraju razni derivati benzofenona. Među njima, se najčešće spominju prenilirani benzofenoni koji se dijele u dvije skupine, na prave benzofenone i poliizoprenilirane benzofenone. Poliizoprenilirane benzofenone osim u tropskom propolisu nalazimo i u vrstama propolisa umjerenog pojasa, samo u manjim količinama (KUMAR i sur., 2013.).

### 2.2.3. Hlapljivi spojevi

Opstanak biljaka često ovisi o drugim biljnim i životinjskim vrstama pa su one evolucijski razvile poseban sustav komunikacije. U navedenu svrhu biljke sintetiziraju i ispuštaju hlapljive organske spojeve (engl. *volatile organic compounds*, VOCs) među kojima su najčešći terpeni (ROSENKRANZ i sur., 2021.). Terpeni su raznolika skupina spojeva koji se sastoje od minimalno pet ugljikovih atoma (5C), a i naziv dobivaju prema njihovom broju pa ih je tako moguće podijeliti na: hemiterpen izopren (5C), monoterpen (10C), seskviterpen (15C), homoterpen (11C i 16C), diterpen (20C), sesterterpen (C25), triterpen (30C), tetraterpen (40C) i politerpen (više od C40 do  $C50 \times 10^{3-4}$  jedinica). Oni imaju razna svojstva pa mogu biti ciklički ili aciklički, hidrofilni ili lipofilni, hlapljivi ili nehlapljivi i kiralni ili akiralni. Hlapljivim terpenima razne funkcionalne skupine povećavaju hlapljivost, a obilno su prisutni u biljnim esencijalnim uljima i odgovorni su za sastavnice citrusnog mirisa, mirisa mentola i zimzelenog lišća. Kompleksni spojevi koji u svojoj strukturi sadrže više funkcionalnih skupina nazivaju se terpenoidi. Glavne uloge terpena su vezane uz međudjelovanje biljaka s drugim organizmima u svrhu razmnožavanja, obrane i simbioze, pa tako spojevi mogu služiti kao atraktanti, repelenti, toksini, antibiotici ili spojevi koji sprječavaju hranjenje kukaca dijelovima biljke (BOHLMANN i KEELING, 2008.; ROSENKRANZ i SCHNITZLER, 2016.; TETALI, 2018.; TLAK GAJGER i DAR, 2021.). Navedene uloge ne zaobilaze ni interakcije s pčelama. Poznato je da pčele različitim intenzitetom reagiraju na mirisne spojeve kao što su feromoni matice i mirisi cvjetova. Reakcija

na feromone je pčelama urođena, no prepoznavanje cvjetnog mirisa rezultat je procesa učenja. S vremenom pčele nauče razlikovati vrste cvjetova povezujući nektar i pelud s mirisom i izgledom određenog cvijeta, a sličan proces učenja se vjerojatno može primijeniti i na prikupljanje propolisa (SMITH i COBEY, 1994.; BANKOVA i sur., 2014b.). LEONHARDT i suradnici (2010.) su proveli istraživanje i dokazali da tropske pčele bez žalca roda *Melipona* koriste mirisne znakove kako bi pronašle biljnu vrstu s koje će prikupiti propolis. Pri tome se oslanjaju na monoterpe i seskviterpe, a modifikacijom uzoraka dokazali su da pčele ne koriste sve mirisne sastavnice ekstrakta pri pronalaženju određenih biljnih smola. Navedeno svojstvo im omogućuje učenje mirisnog profila smole određene biljne vrste pa čak i individualnog drveta kojem se vraćaju.

Hlapljivi spojevi su zaslužni za karakterističan miris propolisa i dio biološke aktivnosti, no nisu prisutni u velikim količinama. Prema HUANGU i suradnicima (2014.) hlapljivih spojeva u propolisu ima samo oko 10 %, a većina takvih spojeva je svrstano u skupinu terpena. Drugi autori tvrde da je udio hlapljivih tvari u propolisu i niži, odnosno tipično niži od 1 %, a rijetko između 2 % i 3 %. Osim terpena, od ostalih hlapljivih spojeva izolirani su i prenilirani acetofenoni, benzil benzoat, fenoni i esteri aromatskih kiselina. Nadalje, u vrlo malenim količinama u brazilskom propolisu izolirani su i alkoholi (benzilni alkohol, 1-feniletanol i 1-fenilpropanol), aldehidi (benzaldehyd, vanilin i p-metoksibenzaldehyd) i ketoni (acetofenon i indanon) (BANKOVA i sur. 1998b.; SUN i sur. 2012.). Bez obzira na malene udjele, ovi spojevi su neodvojivi od propolisa te služe za razlikovanje lažnog i lošijeg propolisa od propolisa dobre kvalitete, a iskazuju i brojna biološka svojstva s naglašenom antioksidacijskom i antimikrobnom aktivnošću. Otprilike je 160 raznih terpena (uključujući terpenoide) pronađeno u propolisu. Najčešće izolirani terpeni i terpenoidi uključuju monoterpe, seskviterpe, diterpe, triterpe, monoterpenoide, diterpenoide i triterpenoide (KASOTE i sur., 2022.).

Izolirani spojevi ovise i o vrsti propolisa korištenoj za izolaciju. Europski propolis od hlapljivih spojeva najviše sadrži seskviterpe, a izolirani su i aromatski benzil acetat, benzilni alkohol i benzil benzoat. Prema količinama određenih hlapljivih spojeva propolis iz umjerenog klimatskog pojasa se može podijeliti na dva tipa: prvi koji u većim količinama sadrži seskviterpen  $\beta$ -eudesmol (40 % do 60 %) i drugi koji sadrži benzil benzoat (20 % do 40 %) (PETRI i sur., 1988.; PAVLOVIĆ i sur., 2020.). Na udio terpena u propolisu određene regije ne utječe samo biljni izvor nego i prisutnost nekih drugih čimbenika. Propolis iz portugalske regije Algarve sadrži preko 70 hlapljivih spojeva među kojima su najčešće seskviterpen

viridiflorol i alkani n-nonadekan i n-trikozaan, no u određenim uzorcima pronađene su veće količine timola. Monoterpenoid timol se samostalno ili u kombinaciji s još nekim hlapljivim tvarima koristi za suzbijanje ektoparazita kod medonosnih pčela i to nametničke grinje *Varroa destructor*. Iako je aplikacija timola vrlo jednostavna te postoji i njegov sintetički oblik, dugotrajnom primjenom može doći do neželjenih posljedica kao što su uginuće pčela i pojava rezidua u pčelinjim proizvodima. Timol je minimalno toksičan za ljude, no njegova je prisutnost u propolisu tretiranih pčela puno veća i može se smatrati kriterijem kvalitete samog propolisa (MIGUEL i sur., 2013.; BANKOVA i sur., 2014b.).

Geografske i klimatske regije u kojima nalazimo propolis se ponekad isprepliću, no bez obzira na to moguće je uočiti razlike u njihovim sastavima. Iako su nalazišta mediteranskog propolisa geografski vrlo blizu nalazištima propolisa topola tipa, zastupljenost različitih skupina terpena nam ukazuje da je riječ o zasebnom tipu propolisa. Zbog korištenja drukčijih izvora kao što su zimzelene biljke (uz prisutne vrste topole) je iz mediteranskog propolisa najčešće moguće izolirati monoterpena kao što je  $\alpha$ -pinen (MELLIU i sur., 2007.). Osim monoterpena, mediteranski propolis karakteriziraju i veće količine diterpena pa su tako POPOVA i suradnici (2010.) izolirali 37 diterpena iz propolisa raznih grčkih regija, među kojima je 20 prepoznato prvi puta. Osim u uzorcima iz Grčke, diterpeni su pronađeni i u drugim zemljama kao što su Hrvatska, Italija, Malta, Turska, Cipar, Egipat, Libija, Alžir i Maroko (EL-GUENDOZ i sur., 2019.).

Tropski propolis pokazuje puno veće razlike zbog prisutnosti mnoštva biljnih izvora za stvaranje propolisa u pčelinjem okolišu. Seksviterpeni su često izolirani iz tropskog propolisa, a ledol, spatulenol i germakren-D je moguće izolirati samo iz tropskog propolisa. Zeleni brazilski propolis jedna je od najistraživanijih vrsta tropskog propolisa, a od hlapljivih spojeva se iz njega također najčešće mogu izolirati seskviterpeni. Osim seskviterpena u brazilskom propolisu nalaze se diterpenske kiseline kao što su klerodanski derivati i labdanske kiseline (BANKOVA i sur., 2000.; BANKOVA i sur., 2014b.). Druge vrste tropskog propolisa također određuje udio terpena pa se tako kubanski žuti propolis prema udjelu terpenoida i njihovih derivata može podijeliti na tip A u kojemu prevladavaju terpenoidni alkoholi i na tip B u kojemu prevladavaju triterpenoidi kao što su oleanan, lupan i ursan (HERNÁNDEZ i sur. 2010.). Prisutnost terpena dokazana je i u tropskom propolisu s drugih kontinenata pa tako i indonezijski propolis, kojem su glavni izvori biljke *Macaranga tanarius* L. i *Mangifera indica* L., u sastavu sadrži tri terpena cikloartanskog tipa (TRUSHEVA i sur., 2011.).

Osim klimatskih karakteristika područja na kojem je prikupljen i vrsta pčele skupljačice utječe na udio terpenoida. Na brazilskom području uočena je razlika u sastavu propolisa različitih vrsta pčela bez žalca s istog područja. BANKOVA i suradnici (1999.) su istraživali uzorke brazilskog propolisa tri različite vrste pčela i to *Melipona compressites*, *Tetragona clavipes* i *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Iz uzoraka su autori izolirali različite seskviterpene i monoterpene, no udjeli pojedinih spojeva u uzorcima nisu bili jednaki iako su svi uzorci prikupljeni na istom području. Nadalje, analizom i utvrđivanjem terpena drugih triju vrsta pčela bez žalca roda *Frieseomelitta* (*F. silvestrii*, *F. silvestrii languida* i *F. varia*) su PATRICIA i suradnici (2002.) utvrdili monoterpen  $\alpha$ -pinen, seskviterpene  $\beta$ -kariofilen,  $\alpha$ -kubeben,  $\alpha$ - i  $\gamma$ -muurolen,  $\gamma$ -kadinen, germakren-D i elemol te diterpene manol i totarol, ali se njihov udio i zastupljenost razlikovala kod pojedinih vrsta pčela. Također, zaključili su da ove vrste nose propolis isključivo na tibiji trećeg para stražnjih nogu. Navedene razlike u terpenoidnom sastavu nastaju zbog činjenice da pčele različitih vrsta preferiraju smole drukčijih biljaka. Terpene su sadržavali i uzorci propolisa malezijskih pčela bez žalca vrste *Heterotrigona itama* i to dva novo izolirana triterpena koji su u nižim koncentracijama popraćeni fenolnim kiselinama, flavonoidima i polisterolima (ZHAO i sur., 2017.). U još je jednom istraživanju propolisa iste vrste pčela potvrđena velika zastupljenost terpenoida, a uzorci su pokazali učinkovitu inhibiciju upalnih medijatora, iako im je antioksidacijska aktivnost bila vrlo slaba (ZHANG i sur., 2020.).

#### 2.2.4. Manje zastupljeni elementi i spojevi

U propolisu se osim navedenih spojeva nalaze i brojni drugi spojevi koji doprinose njegovoj cjelovitosti. RAMNATH i suradnici (2015.) su analizom indijskog propolisa medonosne pčele *Apis mellifera* zaključili da se uz ranije spomenute spojeve propolis sastoji i od steroidnih spojeva (11,5 %), ugljikovodika (9,6 %), šećera (6,4 %), alkaloida (6,4 %), ketona (2,1 %), aminokiselina (2,1 %), vitamina (2,1 %) i ostalih sastavnica (15 %). Udio pojedinih navedenih spojeva može biti i različit od navedenog pa su u nekim vrstama propolisa najčešće utvrđeni šećerni spojevi. Prisutnost šećera u propolisu se često dovodi u vezu s prisutnošću šećera u medu. Jedna skupina autora smatra se da je nektar izvor fruktoze, glukoze i saharoze pronađene u propolisu, dok drugi smatraju da šećeri propolisa dolaze od glikozida hidroliziranih flavonoida ili iz biljne sluzi (QIAN i sur., 2008.; HUANG i sur., 2014.; BANKOVA i sur., 1998a.). Šećeri se navode kao glavne sastavnice malezijskog propolisa tri

različite vrste pčela bez žalca, *Tetrigona apicalis*, *Tetrigona binghami*, i *Homotrigona fimbriata*. Njihov propolis sadrži 31,4 % šećernih spojeva, 11,4 % šećernih alkohola, 5,7 % ugljikovodika, 5,7 % aldehida i 2,9 % aminokiselina. Propolis pčele vrste *T. apicalis* je sadržavao najveće koncentracije šećera, a propolis vrste *T. binghami* najveće koncentracije šećernih alkohola. U uzorcima su ustanovljeni šećeri riboza, glukoza, fruktoza i galaktoza te šećerni alkoholi arabitol, ribitol, arabinitol i D-glucitol (SALLEH i sur., 2021.). Šećeri i šećerni alkoholi pronađeni su i u drugim vrstama propolisa. Uzorci propolisa sa Solomonskih Otoka, iz Kenije, Bugarske, Tanzanije, Zambije i Indije su sadržavali šećere kao što su glukoza, fruktoza, saharoza, galaktoza i stahioza u udjelima do najviše 1,15 % (za saharozu), a većina spojeva pronađena je u tragovima (QIAN i sur., 2008., RAMNATH i sur., 2015.). Monosaharidi, disaharidi i šećerne kiseline kao što su uranska kiselina pronađeni su u 17 uzoraka malteškog propolisa (POPOVA i sur., 2011.), a i kanarski propolis je neobično bogat šećerima. BANKOVA i suradnici (1998a.) su analizom dva uzorka propolisa s Kanarskih otoka po prvi puta u propolisu utvrdili šest vrsta šećera i osam vrsta šećernih alkohola. Također, osam šećernih spojeva izolirano je i iz egipatskog propolisa, a među njima je bilo četiri nova šećera i šećerna derivata: galaktitol, glukonska kiselina, galakturonska kiselina i 2-O-glicerilgalaktoza (EL HADY i HEGAZI, 2002.). Do danas i dalje nije potvrđen izvor šećera koji se može pronaći u uzorcima propolisa.

Ugljikovodici prisutni u propolisu su najčešće vezani uz vosak. Voskovi su mješavine dugolančanih i nepolarnih spojeva koji se nalaze na površinama nekih biljaka ili životinja. Pčele u starosti od 12 do 18 dana izlučuju vosak pomoću voskovne žlijezde, a u njegovom sastavu su razni ugljikovodici, esteri i slobodne kiseline (FRATINI i sur., 2016.; TULLOCH, 1970.). NEGRI i suradnici (1998.) su analizirali vosak iz 23 uzoraka brazilskog propolisa. U propolisu se nalazi različita količina voska, a u navedenim uzorcima su udjeli voska bili od 2 % do 16 %. Većina izoliranih spojeva u tom vosku su bili monoesteri (58 % do 88,5 %), a zatim i ugljikovodici (1,2 % do 37,5 %) i to većinom alkani. Među esterima propolisa su se isticala palmitinska i oleinska kiselina. Bez obzira na činjenicu da je vosak dio sirovog propolisa, moguće ga je iz uzorka odvojiti hlađenjem nakon otapanja u vrućem alkoholu, a izdvojeni vosak je bijele boje. Glavne sastavnice voska raznih vrsta kukaca su alkani, alkeni, alkadieni, monoesteri, diesteri, aromatski esteri, ketoni i masne kiseline (SEIFERT i HASLINGER, 1989.). Biljni vosak se od pčelinjeg razlikuje po većem udjelu alkohola, a manjem udjelu slobodnih masnih kiselina. Uzevši navedene činjenice i sastav voska u obzir su NEGRI i suradnici (1998.) sugerirali da vosak iz propolisa izlučuju pčele te da on nije

podrijetlom od voska biljaka te da njegov sastav ovisi isključivo o genetici pčela. Ugljikovodike su u brazilskom propolisu izolirali i BANKOVA i suradnici (1995.), a neki od izoliranih spojeva bili su oktadekan, nonadekan, ksilen i pentakosan. Količine ugljikovodika u uzorcima su se razlikovale. Također su uzorci propolisa iz Portugala, Egipta, Anatolije te uzorci zelenog propolisa iz Brazila sadržavali razne vrste alkana, masnih kiselina, estera i steroida (sterola) (MIGUEL i sur., 2013.; HEGAZI i EL HADY, 2002.; UZEL i sur., 2005.; TEIXEIRA i sur., 2005.). Steroidi su skupina cikličkih organskih molekula koje sadrže velike količine energije, a neki od njih kao što su aldosterol, kolestan, lanosterol i stigmasterol su izolirani iz indijskog propolisa (RAMNATH i sur., 2015.).

Alkaloidi su uz prije spomenute skupine, također, izolirani iz propolisa. Do nedavno se smatralo da propolis ne sadržava spojeve s dušičnim sastavnicama kao što su alkaloidi, glukozinolati i cijanogeni jer se oni često ne nalaze na površinskim dijelovima biljaka (SALATINO i sur., 2011.). Međutim, novija istraživanja pokazuju suprotno. COELHO i suradnici (2015.) su prvi puta utvrdili pirolizidinske alkaloidne u uzorcima brazilskog geopropolisa pčela bez žalca vrste *Scaptotrigona postica*, a tri godine kasnije su objavili rezultate istraživanja propolisa iste vrste pčela te su potvrdili prisutnost pirolizidinskih alkaloida uz prisutnost dušičnih derivata hidroksicinamične kiseline (COELHO i sur., 2018.). CISILOTTO i suradnici (2018.) su iz brazilskog propolisa pčele *Scaptotrigona bipunctata* izolirali još jednu skupinu alkaloida i to piperidinske alkaloidne. POPOVA i suradnici (2019.) smatraju da se zbog prisutnosti alkaloida i to posebno pirolizidinskih alkaloida propolis pčela bez žalca ne može smatrati bezuvjetno netoksičnim pogotovo jer alkaloidi nisu često izolirani iz propolisa medonosnih pčela. U istraživanju alžirskog propolisa metodama plinske kromatografije i masene spektrometrije (GS-MS) utvrđeno je osam alkaloida među kojima su morfolin, pagicerin, demekolcin i papaverin te šest alkaloidnih derivata (SOLTANI i sur., 2017.). Osim alžirskog propolisa i indijski propolis medonosne pčele sadrži alkaloidne kao što su strihan, ciklopropan benzol, papaverolin, homoeritranin i neronin (RAMNATH i sur., 2015.). KASOTE i suradnici (2022.) napominju da je ove rezultate potrebno potvrditi i izolacijom navedenih alkaloida jer njihova prisutnost u propolisu medonosnih pčela do sad nije bila uobičajena. Alkaloidi su velika i raznolika skupina spojeva koji su služili kao primjer za sintezu važnih antibiotika kao što su metronidazol i kinoloni. Uz antibakterijsku aktivnost, između ostalog imaju i antimalarijsku, antivirusnu, vazodilatacijsku, protuupalnu, antitumorsku i antiasmatsku aktivnost, no neki od njih mogu biti i toksični (CUSHNIE i sur., 2014.).

Aminokiseline su svim živim bićima važne za rast, održavanje i obranu tijela te za razmnožavanje. S obzirom na to da je većina pčela ne obavlja reprodukciju ulogu njihova potreba za aminokiselinama se mijenja kroz život. Na početku života su hranjenje matičnom mliječi kao glavnim izvorom proteina, a kasnije aminokiseline dobivaju iz peludi (PAOLI i sur., 2014.). Zbog toga pri njegovom prikupljanju odabiru biljne izvore bogate aminokiselinama (ALM i sur., 1990.). Aminokiseline je moguće pronaći i u propolisu, a njihov sastav dolazi iz biljnih smola i iz pčelinje slinje kao proizvod njihovog metabolizma (MARCUCCI i sur., 1996.). Analizom turskog propolisa u uzorcima je pronađeno svih 17 ispitivanih aminokiselina i to leucina u najvećim količinama, a triptofana u najmanjim količinama (EROGLU i sur., 2016.). Aminokiseline su pronađene i uzorcima malezijskog, brazilskog i indijskog propolisa. U uzorcima malezijskog propolisa pčele vrste *T. apicalis* pronađene su najveće količine piroglutaminske kiseline, u uzorcima indijskog propolisa pronađen je glicin i njegovi polipeptidi, a u uzorcima brazilskog propolisa je pronađeno više aminokiselina s najvećim količinama aspartanske kiseline, glutaminske kiseline i leucina (SALLEH i sur., 2021.; RAMNATH i sur., 2015.; MARCUCCI i sur., 1996.). Osim aminokiselina, vitamini i mineralni elementi imaju bitnu ulogu u metabolizmu pčela. S obzirom na to da je propolis usko vezan uz biljke od kojih potječe, u tragovima su pronađeni vitamini B1, B2, B6, C i E te minerali poput srebra, cezija, žive, bakra, magnezija, željeza, kalcija, aluminijska, natrija, kalija i drugih (EROGLU i sur., 2016.; RAMNATH i sur., 2015.; SALLEH i sur., 2021.; CVEK i sur., 2008.; DOGAN i sur., 2006.).

### 2.3. Metode ekstrakcije

Sirovi propolis obiluje elementima i spojevima zaslužnima za njegovo biološko djelovanje. Uz biološki vrijedne spojeve u uzorcima se nalaze i spojevi koje živa bića ne mogu metabolizirati ili iskoristiti pa ih je prije istraživanja i primjene potrebno različitim postupcima odvojiti iz uzorka. Poželjne i nepoželjne sastavnice odvajaju se različitim metodama ekstrakcije. Ekstrakcija je postupak odvajanja određenih tvari iz čvrste smjese pomoću otapala ili drugim suvremenijim metodama. Svaka od metoda ekstrakcije ima svoje prednosti i nedostatke, a i svojstva konačnog ekstrakta ovise o odabranoj metodi. Također, pri odabiru metode ekstrakcije potrebno je uzeti u obzir i osobitosti različitih vrsta propolisa te primijeniti onu metodu koja će odvojiti najviše aktivnih spojeva. Propolis obiluje smolama i nepolarnim spojevima pa je slabije topljiv u nekim polarnim otapalima kao što je voda. Zbog toga se pri



ekstrakciji propolisa najčešće koriste organska otapala koja će odvojiti vrijedne sastavnice propolisa te metode kojima će se ukloniti ili otopiti vosak kojeg u propolisu ima do 20 % (BANKOVA i sur., 2021.). Pri maceraciji sastavnice čvrste tvari prelaze u tekuću fazu. Prelazak propolisa iz krute u tekuću fazu se događa brže nego što je to karakteristično za ovakav tip reakcije zbog djelomičnog otapanja njegovog čvrstog matriksa i razaranja manjih čestica u kontaktu s otapalom (TSIBRANSKA i sur., 2012.). Nadalje, na dinamiku ekstrakcije utječe i činjenica da propolis ne sadrži netopivi unutarstanični matriks kojeg sadrže ljekovite biljke na koje se primjenjuju iste ekstrakcijske metode. Uzorke je prije ekstrakcije potrebno pripremiti kako bi bitni spojevi ostali sačuvani, a odabrana metoda određuje i konačni sastav ekstrakta. Pri ekstrakciji biljaka osnovni uzorak može biti svjež ili osušen i samljeven ili u prahu. Prednost se daje osušenim uzorcima, a neke od metoda sušenja su sušenje na zraku, mikrovalno sušenje, sušenje pomoću toplinske energije i sušenje zamrzavanjem (liofilizacija). Također, usitnjavanjem se povećava dodirna površina uzorka i otapala što omogućava bržu reakciju (AZWANIDA, 2015.). Uzorci propolisa se najčešće zamrzavaju preko noći na temperaturi od  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  te se zatim usitnjavaju korištenjem mlina za kavu ili drugačijeg uređaja kako bi se dobila veličina čestica od  $10\text{ }\mu\text{m}$  do  $80\text{ }\mu\text{m}$  (BANKOVA i sur., 2016.). Nakon pripreme uzoraka slijedi postupak ekstrakcije, a u slučaju propolisa se najčešće koriste maceracija, ekstrakcija Soxhletovim instrumentom, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija superkritičnim tekućinama, ekstrakcija pod visokim tlakom, ekstrakcija prirodnim dubokim eutektičnim otapalima i ekstrakcija čvrste faze (BANKOVA i sur., 2021.).

### 2.3.1. Maceracija

Najstarija i najčešće korištena metoda ekstrakcije je maceracija propolisa u alkoholnom otapalu. Ova metoda najčešće se koristi i danas što potvrđuje mnoštvo znanstvenih radova na temu sastava i svojstava alkoholnih ekstrakata propolisa i to najčešće etanolnih ekstrakata ili ekstrakata dobivenih maceracijom u mješavini etanola i vode. Pri procjeni uspješnosti ekstrakcije analiziraju se utjecaji nekoliko parametara samog procesa ekstrakcije te svojstva konačnih ekstrakata. Parametri koji utječu na proces ekstrakcije su vrsta otapala, omjer krute tvari i otapala, trajanje ekstrakcije i temperatura. Nakon ekstrakcije, uzorci se procjenjuju prema ukupnoj količini dobivenog ekstrakta, količini bioaktivnih tvari (npr. fenola i flavonoida) te učincima ekstrakta kao što su antioksidacijski, antimikrobni i antivirusni učinak.

Odabrano otapalo se pri ekstrakciji dodaje krutom uzorku u različitim omjerima. U literaturi su navedeni omjeri krutog uzorka propolisa i dodanog otapala između 1:3 i 1:20, a najčešće su korišteni omjeri u rasponu od 1:5 do 1:10 (ŠURAN i sur., 2021a.). Analizom rezultata brojnih radova BANKOVA i suradnici (2021.) zaključili su da je za ekstrakciju propolisa optimalno otapalo ono u kojem je koncentracija alkohola u vodi između 70 % i 95 %. Osim otapala bitno je i vrijeme trajanja ekstrakcije koje je u istraživanjima promjenjivo zbog različite veličine čestica prije postupka te protokola miješanja i protresanja uzoraka. Međutim, autori navode da trajanje ekstrakcije dulje od tri dana ne pridonosi količini dobivenog ekstrakta. Rezultati se ponekad razlikuju pa je tako u literaturi moguće pronaći i drugačije podatke. Prema nekim autorima mješavina propolisa i otapala treba ostati u zatvorenoj posudi između 7 i 30 dana, a trajanje ekstrakcije od 10 dana navedeno je kao optimalno. Produljeno vrijeme trajanja ekstrakcije na 20 i 30 dana, prema ovom istraživanju, rezultira neznatnim povećanjem količine polifenola u dobivenim uzorcima (CUNHA i sur., 2004.). PARK i IKEGAKI (1998.) su procjenjivali antimikrobnu aktivnost različitih etanolnih ekstrakata prema bakteriji *S. aureus* te antioksidacijsku aktivnost i inhibiciju hijaluronidaze. Došli su do zaključka da su najaktivniji bili oni uzorci koji su dobiveni ekstrakcijom vodenom otopinom etanola koncentracije od 60 % do 80 %, a manje i veće koncentracije od navedenih su imale znatno manju aktivnost. Ipak njihovi uzorci propolisa su ekstrahirani kratkotrajnom ekstrakcijom protresanjem uzoraka na 70 °C u trajanju od 30 minuta, a u većini se drugih radova dugotrajniji postupak odvijao na sobnoj temperaturi kroz nekoliko dana. Nakon maceracije potrebno je odvojiti otopljene i neotopljene čestice filtracijom. Ponekad se postupak ekstrakcije ponavlja koristeći talog koji je ostao nakon filtracije, a za potrebe istraživanja se filtrat može i zamrznuti na -16 °C kako bi se dodatno smanjila količina voska u uzorku (BANKOVA i sur., 2016.). Dobiveni filtrati se prema svojim svojstvima koriste kao aktivni farmaceutski sastojak (engl. *active pharmaceutical ingredient*, API), aktivni kozmetički sastojak (engl. *active cosmetic ingredient*, ACI) i funkcionalni sastojak hrane (engl. *functional food ingredient*, FFI). Jakost ekstrakta se može iskazati i omjerom lijeka i ekstrakta (engl. *drug-to-extract ratio*, DER) koji predstavlja omjer mase sirovog propolisa i dobivenog ekstrakta npr. 1:10 za 100 g dobivenog ekstrakta od 10 g sirovog propolisa. Za dobivanje krutog ekstrakta postupak se odvija na jednak način, no na kraju je otapalo potrebno evaporirati na 70 °C pod vakuumom (ŠURAN i sur., 2021a.). Opisane su razne varijacije protokola korištenog pri ekstrakciji etanolom i ostalim alkoholima.

Osim alkoholnih otapala i druge vrste otapala korištene su pri ekstrakciji propolisa. U istraživačke svrhe koriste se otapala različite polarnosti kao što su voda, etilni acetat, kloroform

i benzen, a za komercijalnu upotrebu koriste se razna uljna otapala, glicerol i polietilen glikol 200, 400 ili 600. Neki autori su za maceraciju propolisa koristili i prirodna uljna otapala kao što su biljna ulja među kojima su sojino ulje, repičino ulje, maslinovo ulje, kokosovo ulje pa čak i neka esencijalna ulja. Uzevši svojstva otapala u obzir potrebno je za svako otapalo prilagoditi postupak maceracije (IVANČAJIĆ i sur., 2010.; BANKOVA i sur., 2021.). Potraga za novim otapalima i dalje traje pa se u literaturi mogu pronaći i različita zanimljiva otapala poput medice (FREITAS i sur., 2022.). Pri provjeri učinkovitosti novih otapala se svojstva ekstrakata najčešće uspoređuju sa svojstvima etanolnih ili vodenih ekstrakata. Među sigurnim i netoksičnim polarnim otapalima propolisa se u literaturi ističu glicerol i polietilen glikol. Polarnost ovih otapala im omogućava ekstrakciju polarnih spojeva propolisa, a u usporedbi s vodom ekstrakti načinjeni polietilen glikolom sadrže veći totalni udio fenola te veću antioksidacijsku aktivnost (KUBILIENE i sur., 2018.). ŠURAN i suradnici (2021b.) su uspoređivali kemijski sastav, antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost dva ekstrakta propolisa: jedan ekstrahiran otopinom polietilen glikola 400 (PEG 400) i jedan ekstrahiran 96 %-tnim etanolom. Maceracijom propolisa u etanolu dobiveno je 3,7 % više ekstrakta nego maceracijom u PEG-u 400, a i koncentracije svih markera osim kampferola su bile više u etanolnom ekstraktu. Međutim, bez obzira na veću dobivenu količinu ekstrakta i veće koncentracije markera nije bilo značajne razlike u antioksidacijskoj aktivnosti. Također, oba ekstrakta su bila djelotvorna protiv svih ispitivanih patogenih mikroorganizama uz veću djelotvornost etanolnih ekstrakata protiv svih, osim *Escherichia coli* i to vjerojatno zbog prisutnosti veće količine kampferola u uzorku s polietilen glikolom. Pri korištenju polietilen glikola kao otapala postoje određene limitacije, a jedna od njih je smanjena mogućnost miješanja s sirovim propolisom zbog veće viskoznosti, no viskoznost otapala se može promijeniti zagrijavanjem. Kako bi se povećala ekstrakcijska moć nepolarnih spojeva polarnim otapalima je moguće dodati emulgatore. RADIĆ i suradnici (2020.) su patentirali inovativnu metodu ekstrakcije propolisa dodatkom emulgatora, kao što je lecitin, polietilen glikolu prilikom maceracije propolisa. Glavne prednosti primjene polietilen glikola i lecitina su njihova netoksičnost i učinkovito otapanje tvari poput voska pa ga nije potrebno dodatno uklanjati. Ekstrakti dobiveni na ovaj način su sigurni te pogodni za primjenu i razvoj proizvoda na bazi propolisa. Uzevši u obzir svojstva polietilen glikola može ga se smatrati dobrom i manje toksičnom zamjenom za etanol.

Etanol je najčešće korišteno, jeftino i dobro otapalo, a uspješnost ekstrakcije ovisi o jačini etanola iz čega proizlazi da se s povećanjem koncentracije etanola u otapalu povećava i

količina ekstrahiranih tvari. Ipak riječ je o vrlo agresivnom otapalu koje nije prikladno za bezuvjetnu upotrebu pa tako proizvodi na bazi alkohola nisu prikladni za upotrebu kod djece, trudnica i ovisnika te u veterinarskoj medicini (ŠURAN i sur., 2021a.). Nadalje, u ekstraktu nakon maceracije ostaje relativno velika količina voska koji se odvaja prilikom miješanja s vodom što nije idealno za proizvodnju kozmetičkih i drugih proizvoda. Također, u slučaju nekih drugih prirodnih ekstrakata nakon evaporacije etanola u uzorku mogu ostati rezidue otapala. Prema smjernicama Međunarodnog vijeća za harmonizaciju tehničkih zahtjeva za lijekove za ljudsku upotrebu (engl. *International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use*, ICH) rezidualna otapala se dijele u tri razreda. U prvi razred se svrstavaju otapala koja bi se trebala izbjegavati jer su potencijalno ili dokazano kancerogena te opasna za okoliš. Otapala koja trebaju biti ograničena zbog potencijalne toksičnosti ili za koje se sumnja da su toksični, a da nije riječ o genotoksičnosti svrstavaju se u drugi razred. Naposljetku se u zadnji i treći razred svrstavaju ona otapala koja imaju niski toksični potencijal za ljudsko zdravlje. Prema smjernicama u prvi razred svrstana su otapala kao što je benzen, u drugi razred kao što je metanol, a u treći razred svrstani su aceton i etanol (ANONIMUS, 2022.). VIVIERS i suradnici (2022.) su analizirali rezidue otapala u 279 uzoraka proizvoda na bazi marihuane u Južnoj Africi te došli do zaključka da je 37 % uzoraka sadržavalo rezidue iznad dopuštene količine. Od svih istraživanih zasebnih otapala najviše rezidua je ostavljao etanol, a osim etanola u jednom uzorku ostale su i rezidue metanola iznad dopuštenih količina. Zbog toga je potrebno sustavno pratiti rezidue otapala u prirodnim proizvodima te zamijeniti toksičnija otapala prirodnim i manje toksičnim izborima.

Glavne prednosti maceracije kao metode su njezina jednostavnost i niski troškovi, no maceracijom se stvaraju veće količine organskog otpada. Također, promjenama uvjeta maceracije kao što su temperatura i pH smjese može doći do varijacija u sastavu ekstrakta te produljenog vremena ekstrakcije. Zbog toga, a i zbog opisanih rezidua potrebno je pažljivo odabirati otapala korištena u ovoj metodi (AZWANIDA, 2015.).

### 2.3.2. Ekstrakcija Soxhletovim instrumentom

Godine 1879. Franz von Soxhlet izumio je laboratorijski instrument za ekstrakciju nazvan Soxhlet ekstraktor njemu u čast. Instrument Soxhlet radi na principu ispiranja uzorka u nekoliko uzastopnih ciklusa pa se može usporediti s maceracijom. Princip rada

konvencionalnog aparata je sljedeći: 1. otapalo se nalazi u bočici za destilaciju te se zagrijava na traženu temperaturu; 2. zagrijano otapalo isparava i prolazi kroz destilacijski put do kondenzatora; 3. kroz kondenzator odvojeno prolazi hladna voda i kondenzira pare otapala koje se zatim spuštaju u ekstraktor; 4. u ekstraktoru se nalazi usitnjeni uzorak umotan u filter papir i kroz njega prolazi kondenzirano otapalo; 5. otopljeni dijelovi uzorka, uz otapalo, pod utjecajem gravitacije prolaze kroz sifon nazad u bočicu za destilaciju kad se nakupi dovoljna količina tekućine; 6. ciklus se ponavlja potreban broj puta uzevši u obzir činjenicu da isparavaju samo pare otapala, a sastavnice uzorka ostanu u bočici. Na kraju se otapalo i otopljeni uzorak odvajaju metodama prilagođenim njihovim svojstvima kao što rotirajuća evaporacija ili destilacija (DE CASTRO i PRIEGO-CAPOTE, 2010.). Na ovu vrstu ekstrakcije utječu odabir otapala i trajanje ekstrakcije. Među otapalima koja se koriste u ovom postupku ekstrakcije propolisa su kloroform, etil acetat, etanol te mješavina etanola i vode, a uspješnost ekstrakcije se procjenjuje prema količini dobivenog ekstrakta, količini fenola i flavonoida te svojstvima ekstrakta (BANKOVA i sur., 2021.). Znanstvenici su se u istraživanjima koristili uputama CUNHE i suradnika (2004.) pa su tako fino usitnjen uzorak propolisa mase 20 g ekstrahirali u 400 ml otapala, 24 sata na maksimalnoj temperaturi od 60 °C za apsolutni alkohol, a na 100 °C za destiliranu vodu. Ekstrakti su nakon postupka preko noći zamrznuti kako bi se potaknula kristalizacija otopljenih voskova, a zatim su i filtrirani na 0 °C. Nekoliko istraživačkih skupina ekstrahiralo je najviše fenola i flavonoida pri ekstrakciji mase uzorka od 5 g u 150 ml apsolutnog etanola u trajanju od 4 do 6 sati na 60 °C (PAVIANI i sur., 2013.; MONROY i sur., 2017.). BISCAIA i FERREIRA (2009.) su uspoređivali količine dobivenog ekstrakta korištenjem različitih otapala: etanola, etilnog acetata, kloroforma, n-heksana, vode te mješavine vode i etanola. Najveće količine ekstrakta propolisa ekstrahirane su korištenjem kloroforma u Soxhletovom ekstraktoru.

Zaključno, glavne prednosti ove metode su korištenje manje količine otapala, recikliranje otapala i smanjeno vrijeme ekstrakcije, a nedostaci su ekstrakcija samo jednog uzorka, produljeno izlaganje uzorka visokim temperaturama koje oštećuju termolabilne sastavnice, povećana topljivost voska te izlaganje uzorka opasnim i zapaljivim otapalima što može dovesti do emisije toksičnih tvari pa se ova metoda ne smatra ekološki prihvatljivom. Idealni uzorak za korištenje ove metode bi trebao biti krut, fino usitnjen i termostabilan (CUNHA i sur., 2004.; PAVIANI i sur., 2013.; AZWANIDA, 2015.; BANKOVA i sur., 2021.).

### 2.3.3. Ultrazvučna ekstrakcija (engl. *ultrasound-assisted extraction*, UAE)

Metoda ekstrakcije ultrazvučnim valovima u rasponu od 20 kHz do 2000 kHz naziva se ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *ultrasound-assisted extraction*, UAE). Kod ove metode ekstrakcije se uzorak i otapalo u istoj posudi, kroz zadano vrijeme, ostavljaju u ultrazvučnoj kupelji. Akustični ultrazvučni valovi uzrokuju mehanički učinak kavitacije (stvaranja mikrošupljina) koji povećava dodirnu površinu dijelova uzorka i otapala. Kavitacija uzrokuje visoku lokalnu temperaturu i tlak te može smanjiti veličinu čestica uzorka i ubrzati ekstrakciju uzorka u otapalu. Ova metoda se često koristi kod ekstrakcije biljnih dijelova jer povećava permeabilnost biljne stanice i ubrzava proces ekstrakcije. U slučaju propolisa reakcija se još više ubrzava s obzirom na to da propolis ne sadrži cijele biljne stanice (SHIRSATH i sur., 2012.; AZWANIDA, 2015.; BANKOVA i sur., 2021.). U literaturi je najčešće uspoređivana uspješnost ove metode s uspješnošću maceracije, a istraživanja su pokazala da se korištenjem UAE u kraće vrijeme mogu dobiti gotovi ekstrakti s jednako ili više ukupnih fenola i flavonoida. Također, na uspješnost UAE-a utječe odabir otapala, njegova koncentracija, temperatura, vrijeme trajanja ekstrakcije, omjer masa uzorka i otapala te optimalna frekvencija i snaga ultrazvučnih valova. Optimalna koncentracija etanola korištenog u istraživanjima bila je između 70 % i 90 % uz najčešći omjer mase sirovog propolisa i otapala bio je 1:10, ponekad i 1:20. Jedna od glavnih prednosti ove metode je kratko trajanje ekstrakcije koje traje od 12 do 30 minuta pod optimalnom temperaturom od 60 do 65 °C. (TRUSHEVA i sur., 2007.; OROIAN i sur., 2019.; DING i sur. 2019.). Optimalna frekvencija i snaga se rijetko spominju u radovima, a optimalna frekvencija prema OROIANU i suradnicima (2019.) je frekvencija od 20 kHz. TRUSHEVA i suradnici (2007.) u svome istraživanju uspoređuju klasičnu maceraciju, ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima (engl. *microwave-assisted extraction*, MAE) i ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom (engl. *ultrasound-assisted extraction*, UAE) u etanolnom otapalu. Od svih metoda se UAE pokazala najboljom uzevši u obzir trajanje ekstrakcije, selektivnost metode, količine flavonoida i fenola te minimalni udio voska u dobivenom ekstraktu. Pri tome se ekstrakcija odvijala u ultrazvučnoj kupelji snage 300 W na temperaturi od 25 °C u trajanju od 30 minuta. Nadalje, uspoređujući iste metode, OROIAN i suradnici (2019.) su najbolje rezultate dobili korištenjem dvostruke UAE s tim da je u njihovom slučaju navedena metoda dala i najveći prinos ekstrakta što nije bio slučaj u drugim istraživanjima gdje su količine ekstrakta bile podjednake. Veći prinos ukupne količine fenola i ukupne količine flavonoida opisali su i DING i suradnici (2020.). Postupak ekstrakcije

je trajao 30 minuta u ultrazvučnoj kupelji jakosti 200 W i frekvencije valova 40 kHz. Usporedivši udio ukupnih fenola u ekstraktima dobivenim tradicionalnom maceracijom i UAE, kod maceracije su zabilježeni 15 % do 20 % manji udjeli fenola u ekstraktima. PELLATI i suradnici (2013.) su usporedivši MAE i UAE s konvencionalnim metodama utvrdili podjednaku učinkovitost obiju metoda, uzevši u obzir količinu ekstrakta i sastav ekstrahiranog propolisa.

Navedena metoda se smatra ekonomičnom i ekološki prihvatljivom metodom te je jedna od rješenja za proizvodnju prirodnih proizvoda. Prednosti ove metode su kraće vrijeme ekstrakcije i korištenje manje količine otapala, no glavni nedostaci su činjenica da korištenje frekvencija većih od 20 kHz može imati negativan učinak na aktivne spojeve u ekstraktima i da može potaknuti proizvodnju slobodnih radikala. Također, u usporedbi s tradicionalnim metodama troškovi provedbe su nešto veći (BANKOVA i sur., 2021.; AZWANIDA, 2015.).

#### 2.3.4. Mikrovalna ekstrakcija (engl. *microwave-assisted extraction*, MAE)

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *microwave-assisted extraction*, MAE) je relativno nova metoda u kojoj utjecaj energije mikrovalova pospješuje ekstrakciju. Neionizirajući elektromagnetski valovi raspona frekvencije od 0,3 do 300 GHz nazivaju se mikrovalovi. U prirodi mikrovalovi stvaraju električna i magnetska polja koja su okomita jedno na drugo. Električno polje ovih valova omogućava izravno dvostruko zagrijavanje molekula pomoću dvaju mehanizama: dipolarne rotacije i ionske kondukcije. Zagrijavaju se i uzorak i otapalo što povećava njihovu kinetičku energiju i ubrzava proces prijenosa kemijskih spojeva iz uzorka u otapalo. Metoda prvenstveno djeluje na dipole polarnih i polariziranih materijala kojima potaknuta dipolarna rotacija prekida vodikove veze i tako ubrzava migraciju iona u otapalo. Napolarna otapala se puno slabije zagrijavaju pa se energija prenosi samo pomoću dielektrične apsorpcije. Upotreba mikrovalova omogućava ciljano zagrijavanje materijala bez gubitka energije u okoliš, a modernije inačice ove metode omogućavaju ekstrakciju pod tlakom ili ekstrakciju bez otapala (DELAZAR i sur., 2012.; AZWANIDA, 2015.; BANKOVA i sur., 2021.). Nekoliko istraživačkih skupina primjenjivalo je ovu metodu ekstrakcije propolisa te ju je usporedilo s ostalim metodama. Prema navodima autora, prva primjena MAE u ekstrakciji propolisa objavljena je 2007. godine. U istraživanju su uspoređeni parametri i učinci MAE s parametrima i učincima obične maceracije i UAE. Ekstrakcija je provedena koristeći kućni

mikrovalni uređaj snage 800 W u kojem je posudica s uzorkom i otapalom bila izložena mikrovalovima dva do tri puta po 10 sekundi. Ukupni udio fenola i flavonoida je bio najveći nakon dva ciklusa izloženosti mikrovalovima, a dodatkom trećeg ciklusa se udio drastično smanjio. Zaključeno je da je MAE vrlo brza metoda u usporedbi s ostalima, no njena selektivnost je bila niska. Iz ekstrakata su izolirane veće količine neželjenog voska i drugog nefenolnog i neflavonoidnog sadržaja (TRUSHEVA i sur., 2007.). Slične rezultate su dobili OROIAN i suradnici (2019.) usporedivši ranije navedene metode. Autori su provodili dvostruku mikrovalnu ekstrakciju u trajanju od 1 minute, na otprilike 60 °C, koristeći uređaj snage 140 W. PELLATI i suradnici (2013.) su po prvi put optimizirali MAE za ekstrakciju polifenola u sirovom propolisu. Najbolje rezultate su dobili koristeći zatvoreni sustav pri omjeru volumena otapala etanola i vode 80:20 (EtOH-H<sub>2</sub>O 80:20 (v/v)), temperaturi od 106 °C, te u trajanju od 15 minuta. U usporedbi s maceracijom i UAE, MAE je bila najbrža metoda s najmanje utrošene količine otapala. Učinkovitost ekstrakcije MAE bila je podjednaka u usporedbi s UAE metodom.

Prednosti ove metode su kraće trajanje i veći stupanj ekstrakcije, smanjena količina otapala te dostupnost kućnih mikrovalnih uređaja, a među glavnim nedostacima su moguća toplinska degradacija spojeva te ograničenje metode na malene i polarne fenolne molekule poput fenolnih kiselina, kvercetina i izoflavina. Primjena ove metode nije prikladna za ekstrakciju molekula poput tanina i antocijana zbog narušavanja njihove strukture na višim temperaturama. Također, zbog manjka selektivnosti u ekstraktima propolisa ostaje veliki udio neželjenih voskova (DELAZAR i sur., 2012.; AZWANIDA, 2015.; TRUSHEVA i sur., 2007.; OROIAN i sur., 2019.).

### 2.3.5. Ekstrakcija superkritičnim tekućinama (engl. *supercritical fluid extraction*, SFE)

Jedna od ekološki najprihvatljivijih metoda ekstrakcije prirodnih mješavina je ekstrakcija superkritičnim tekućinama (engl. *supercritical fluid extraction*, SFE). Superkritične tekućine na temperaturi i tlaku iznad kritične točke istodobno imaju svojstva plina i svojstva tekućine. One difundiraju kroz otopinu kao plinovi, a otapaju materijale kao tekućina. Najčešće korišteno superkritično otapalo je ugljikov dioksid (CO<sub>2</sub>) koji postaje superkritična tekućina na temperaturama iznad 31,1 °C i tlakovima iznad 7380 kPa. Superkritični ugljikov dioksid (SC-CO<sub>2</sub>) je jeftino i lako obnovljivo otapalo niske toksičnosti pa se često koristi za prirodne



proizvode. S obzirom na to da je riječ o nepolarnom otapalu, ono slabo otapa polarne sastavnice uzorka pa nije najprikladnije za njihovu ekstrakciju. Ipak topljivost polarnih sastavnica moguće je povećati dodatkom polarnih otapala kao što su etanol i metanol. Snagu ovog otapala moguće je lako prilagođavati promjenom temperature, tlaka i dodatkom modifikatora što smanjuje vrijeme trajanja ekstrakcije (AZWANIDA, 2015.). Zbog nepolarosti otapala, samostalna ekstrakcija korištenjem SC-CO<sub>2</sub> nije naročito uspješna pa ju većina autora kombinira s drugim metodama. SAITO i suradnici (2020.) su uspoređivali konvencionalnu i superkritičnu ekstrakciju brazilskog crvenog i zelenog propolisa. Superkritična ekstrakcija događala se pod tlakom od 300 bara i temperaturom od 50 °C. Najuspješnija metoda bila je ekstrakcija metanolom, a zanimljivo je da je etanolni uzorak koji je pročišćen i frakcioniran sa SC-CO<sub>2</sub> imao veći udio flavonoida od etanolnog uzorka bez pročišćavanja i frakcioniranja. Nepolarnost SC-CO<sub>2</sub> omogućuje da se iz ekstrakta uklone nepoželjne i nepolarne tvari. Uspješnost višefazne ekstrakcije etanolom i SC-CO<sub>2</sub> potvrđuje još istraživanja, a tako dobiveni ekstrakti su sadržavali veći udio fenola i flavonoida uz dodatak vrijednih molekula kao što su penilirane cinamične kiseline i artepilin C u ekstraktima brazilskog zelenog propolisa (PAVIANI i sur., 2013.; MONROY i sur., 2017.; BISCAIA i FERREIRA, 2009.).

Glavne prednosti ove metode su relativno blagi uvjeti ekstrakcije, malen utrošak uzorka za ekstrakciju, dobivanje čistih ekstrakata bez zaostalih rezidua otapala i bolji utjecaj na okoliš zbog odsutnosti organskih otapala (IDRUS i sur., 2018.). Ipak korištenje samo ove metode nije prikladno za ekstrakciju propolisa zbog vrijednih polarnih spojeva koji se njome ne mogu ekstrahirati (BANKOVA i sur., 2021.). Također, inicijalni troškovi opreme za superkritičnu ekstrakciju su vrlo veliki (AZWANIDA, 2015.).

### 2.3.6. Metode ekstrakcije pod visokim tlakom

Metode ekstrakcije pod visokim tlakom omogućavaju smanjivanje količine upotrijebljenog otapala, snižavanje troškova ekstrakcije te manji utjecaj na okoliš. Jedna od tih metoda je ekstrakcija pomoću visokog hidrostatskog tlaka (engl. *high hydrostatic pressure extraction*, HHPE). Metoda radi prema Le Chatelievom načelu ravnoteže u sustavima. Ako se u reakciji promjeni tlak, temperatura ili koncentracija reaktanata, sustav će ustrajati u održavanju ravnoteže pa će se pomaknuti u smjeru produkata i obrnuto, ovisno gdje je promjena nastala. Tlak se primjenjuje kako bi potaknuo prijelaz sastavnica uzorka iz jedne faze

u drugu te promjenu dinamike reakcije i molekularne strukture. Navedeni mehanizmi posljedično utječu na smanjenje volumena i povećanje učinkovitosti ekstrakcije. Pri ekstrakciji se koriste tlakovi u rasponu od 100 do 1000 MPa uz primjenu klasičnih otapala (KHAN i sur., 2018.). SHOUQIN i suradnici (2005.) su navedenu metodu koristili za ekstrakciju flavonoida iz propolisa mijenjajući uvjete same reakcije. Mijenjali su vrstu otapala, koncentraciju otapala (od 35 % do 95 %), tlakove (od 100 do 600 MPa), trajanje reakcije (od 1 do 10 minuta) te omjere volumena tekućine i otapala (od 1:5 do 1:45). Najveći prinos flavonoida u ekstraktu dobiven je korištenjem metanola ili etanola, što veće koncentracije (npr. 95 %) i količine (omjer uzorka i otapala 1:45) pod većim tlakom (600 MPa). Zanimljivo je da trajanje procesa nije utjecalo na povećanje koncentracije flavonoida u ekstraktu pa rezultati dobiveni konvencionalnom maceracijom mogu biti ostvareni već za jednu minutu. Veći hidrostatski tlak omogućava da više otapala uđe u matriks i ekstrahira više spojeva. Osim promjene tlaka, ravnoteža reakcije se može pomaknuti i mijenjajući druge parametre. Metoda ekstrakcije otapalom pod pritiskom (engl. *pressurized solvent extraction*, PSE), koja se još naziva i ubrzana ekstrakcija otapalom (engl. *accelerated solvent extraction*, ASE), uz promjenu tlaka koristi i prednosti promjene temperature. Primjena visokog tlaka sprječava ključanje otapala pri visokim temperaturama na kojima ono inače ključa. Ovom metodom je uspješno ekstrahirano više vrsta propolisa, a ekstrakti su imali veliku aktivnost protiv slobodnih radikala (ERDOGAN i sur., 2011.).

Dramatično skraćivanje procesa ekstrakcije na samo jednu minutu uz očuvanje svojstava spojeva zbog korištenja niskih temperatura i smanjeno korištenje energije glavne su prednosti HHPE-a (KHAN i sur., 2018.). Međutim, za ekstrakciju su i dalje potrebna organska otapala, a oprema je vrlo skupa (BANKOVA i sur., 2021.).

### 2.3.7. Ekstrakcija prirodnim dubokim eutektičnim otapalima (engl. *natural deep eutetic solvents*, NADES)

Današnji trend i nastojanja znanstvenika da pronađu što bolja ekološki prihvatljiva, neškodljiva i biorazgradiva otapala sve više idu u smjeru proizvodnje prirodnih dubokih eutektičnih otapala (engl. *natural deep eutetic solvents*, NADES). Najčešće je riječ o prirodnim mješavinama u kojima jedna sastavnica ima svojstva kiseline (proton-donora), a druga sastavnica ima svojstvo lužine (proton-akceptora). Ova otapala imaju nizak tlak pare, visoku toplinsku i elektrokemijsku stabilnost te nisu zapaljiva (CAI i sur., 2019.; GARCÍA-ROLDÁN

i sur., 2023.). Sastavnice NADES-a su nekoliko zasebnih čvrstih tvari čija je reakcija odgovorna za formiranje mješavine s puno nižim talištem od tališta koje imaju te sastavnice zasebno, pa se na sobnoj temperaturi nalaze u tekućem stanju. Kako bi se skratilo trajanje ekstrakcije najčešće se koriste kombinacije NADES i UAE (TRUSHEVA i sur., 2019.). U nastojanju pronalaska dostojne zamjene za etanol FUNARI i suradnici (2019.) su ispitivali 16 NADES-a napravljenih od kemikalija niske toksičnosti koje su uključivale i aminokiseline te sastavnice meda. Njihovi rezultati pokazali su da nekoliko vrsta NADES-a pri temperaturi od 50 °C može zamijeniti ranije poznata otapala. Sa stabilnošću preko 17 mjeseci, najbolje kombinacije otapala koje bi mogle zamijeniti alkoholna i propilenska otapala bile su mješavine kaolin klorida i propilen glikola u omjeru 1:2 i mješavine kaolin klorida, mliječne kiseline i vode u omjeru 1:1:1. TRUSHEVA i suradnici (2019.) su dobili ekstrakte s najviše flavonoida koristeći mješavinu limunske kiseline i propilen glikola u omjeru 1:4, s minimalno slabijim učinkom od ekstrakcije 70 %-tnim etanolom. Istraživanjem je potvrđeno i da sastavnice NADES-a mogu pojačati biološku aktivnost ekstrakata. Zbog toga i drugih prednosti navedene metode moguće je izbjeći komplicirano odvajanje ekstrakta od prirodnog eutektičnog dubokog otapala te se ona mogu uvrstiti izravno u formulaciju. Također, pri odabiru prirodne mješavine treba voditi računa da polarnost i viskoznost otapala bude prilagođena aktivnim tvarima koje je potrebno ekstrahirati jer su ova otapala često velike viskoznosti (BANKOVA i sur., 2021.).

Prednosti ove metode su mogućnost prilagodbe mješavine ciljanim spojevima ekstrakta, lakoća pripreme, doprinos biološkoj aktivnosti ekstrakta, niska toksičnost, slaba zapaljivost i nizak tlak para te biorazgradivost (FERNÁNDEZ i sur., 2018.; TRUSHEVA i sur., 2019.; FUNARI i sur., 2019.). Glavni nedostaci ove metode su velika viskoznost, teško odvajanje ekstrakta od otapala te ograničena stabilnost ekstrakata (BANKOVA i sur., 2021.; FUNARI i sur., 2019.).

### 2.3.8. Ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *solid-phase extraction*)

Ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *solid-phase extraction*) koristi se za odvajanje što više aktivnih tvari iz etanolnih ili vodenih ekstrakata. Za odvajanje se koriste polarne, nepolarne ili srednje polarne makroporozne adsorptivne smole. To su visokomolekulski i izdržljivi materijali selektivne adsorpcije i niske cijene koje je lako obnoviti. Koriste se za uklanjanje nečistoća iz ekstrakata (FU i sur., 2007.). LI i suradnici (2016.) su koristili ovu pripremnu

metodu odvajanja za izolaciju 11 polifenola iz vodotopive frakcije kineskog propolisa. Autori su naveli da je ova metoda jednostavna, učinkovita, brza i lako mjerljiva, a koristi se kao dodatni postupak za analizu ekstrakata u laboratoriju i nije za širu primjenu (BANKOVA i sur., 2021.).

## 2.4. Pregled učinaka propolisa

Ljekovitost propolisa poznata je ljudima nekoliko tisuća godina, ali širok raspon učinaka znanstvenici su počeli otkrivati tek u bližoj povijesti razvojem novih analitičkih metoda. Mnoštvo parametara utječe na biološku aktivnost propolisa pa tako svaki prikupljeni i obrađeni uzorak istraživačima donosi nepresušan izvor informacija. Sa svakim nadolazećim biološkim izazovom čovječanstva i sa svakim provedenim istraživanjem otkrivaju se nove spoznaje o ovoj nezamjenjivoj prirodnoj mješavini.

### 2.4.1. Antibakterijski učinak propolisa

Bakterijske infekcije su u prošlosti bile uzrok velike smrtnosti i brojnih oboljenja pa se otkriće antibiotika i danas smatra jednim od najvažnijih uspjeha u povijesti medicine. Međutim, rastuća bakterijska rezistencija i nedostatak novih antimikrobnih pripravaka bi u budućnosti mogli postati veliki javnozdravstveni problem. Zadnja potpuno nova skupina antibiotika otkrivena je prije više od 30 godina, a pomaci na ovom području su i dalje vrlo spori (DURAND i sur., 2018.; GHOSH i sur., 2020.). Veliki problem u bolničkim sustavima diljem svijeta predstavljaju bolničke infekcije i multirezistentni sojevi bakterija čija prisutnost ugrožava uspješnost i ponekih rutinskih operacija. Stope smrtnosti uzrokovane bolničkim infekcijama se mogu kretati od 2,3 % do 14,4 %, ovisno o vrsti infekcije (AL-TAWFIQ i TAMBYAH, 2014.). Rezistenciji na antibiotike pomaže i prisutnost biofilma na tkivima i ranama te na medicinskom priboru i instrumentima. Bakterijski biofilm je trodimenzionalni sloj bakterijskih zajednica koje se nalaze u isprepletenoj mreži od DNK, proteina i hidratiziranih polisaharida. Zbog činjenice da većina antibiotika djeluje samo na bakterije odvojene od biofilma, on je jedan od uzroka rekurentnih infekcija (VENKATESAN i sur., 2015.). Svi navedeni izazovi i rastuća popularnost prirodnih proizvoda potaknuli su brojna istraživanja i primjenu nekih pripravaka među kojima je i propolis. Dodatne prednosti korištenja propolisa su njegov inhibitorni učinak

na stvaranje bakterijskog biofilma i sinergizam s nekim od široko poznatih antimikrobnih pripravaka (YUAN i sur., 2022.; SFORCIN i BANKOVA, 2011.; OKSUZ i sur., 2005.; ORSI i sur. 2006.; ORSI i sur., 2012b.; WELLINGTON i sur., 2015.).

Kako bi se odredila antibakterijska učinkovitost uzoraka potrebno ih je laboratorijski istražiti, a nakon ekstrakcije se provode *in vitro* testovi. Iako danas postoje visoko sofisticirane metode kao što su razne bioluminiscentne metode i metode protočne citofluorometrije, zbog visokih troškova znanstvenici i dalje češće biraju ranije prepoznate, jednostavnije metode. U navedenom slučaju visoka cijena, prepreke u ponovljivosti te u standardizaciji modernih metoda, zasjenjuju brze i vidljive rezultate. Od jednostavnijih i jeftinijih metoda se u istraživanju propolisa najčešće koriste difuzijske i dilucijske metode. Disk difuzijska metoda je kvalitativan test u kojem se mjeri promjer zone inhibicije bakterijskog rasta oko antimikrobnog sredstva. Disk mora sadržavati navedeno sredstvo u željenim koncentracijama, a postavlja se na površinu agara koji sadrži standardizirani inokulum mikroorganizama. Dilucijske metode su agar dilucijska metoda i dilucijska metoda razrjeđenja bujona (mikro ili makrodilucija). Agar dilucijska metoda obuhvaća ugrađivanje različitih željenih koncentracija aktivne tvari u medij agara koristeći se dvostrukim serijskim razrjeđenjima, a na pripremljene agare se dodaju poznate koncentracije bakterijskog inokuluma. Druga dilucijska metoda je metoda razrjeđenja bujona koja uključuje dvostruka serijska razrjeđenja ispitivanog antimikrobnog pripravka u tekućem hranjivom mediju. Kod makrodilucije medij je raspoređen u epruvete zapremnine minimalno 2 ml, a kod mikrodilucije najčešće se koriste mikrotitarske pločice s 96 jažica. Iza ovih postupaka u navedenim metodama se pločice inkubiraju po standardnim uvjetima koji ovise o ispitivanom mikroorganizmu. Obje metode su kvantitativni testovi kojima se određuje minimalna inhibicijska koncentracija antimikrobnog sredstva. Minimalna inhibicijska koncentracija (MIK) je najmanja koncentracija sredstva koja je potrebna za inhibiciju vidljivog bakterijskog rasta. Najčešće se izražava u mikrogramima po mililitru ( $\mu\text{g/mL}$ ), a u istraživanjima ekstrakta propolisa najčešće se koristi dilucijska metoda razrjeđenja bujona (BALOUIRI i sur., 2016.; PRZYBYŁEK i KARPÍŃSKI, 2019.).

Propolis je složena mješavina mnoštva aktivnih tvari koje jedna na drugu mogu djelovati neutralno, sinergistički ili antagonistički (CHIRUMBOLO, 2011.). Zbog toga je, bez obzira na antibakterijsku aktivnost pojedinih spojeva, ekstrakte propolisa potrebno promatrati kao jednu cjelinu. Na završni sastav ove cjeline utječu svojstva i ograničenja primijenjenih metoda ekstrakcije (WOŹNIAK i sur., 2020.), a zbog jednostavnosti i učestalosti su u istraživanjima najčešće ispitivana antibakterijska svojstva etanolnih uzoraka propolisa. U

preglednom radu su PRZYBYŁEK i KARPÍŃSKI (2019.) analizirali rezultate znanstvenih radova o antibakterijskom utjecaju propolisa na preko 600 bakterijskih sojeva. Uočili su da razni tipovi propolisa bolje djeluju na gram-pozitivne nego na gram-negativne bakterije, uključujući i propolis pčela bez žalca. TORRES i suradnici (2018.) ispitivali su etanolne ekstrakte dviju vrsta pčela bez žalca: vrste *Melipona quadrifasciata* i vrste *Tetragonisca angustula*. Ispitivan je učinak uzoraka na gram-pozitivne bakterije *S. aureus*, meticilin-rezistentni *S. aureus* (MRSA) i *E. faecalis* te na gram-negativne bakterije *E. coli* i *Klebsiella pneumoniae*. Autori su koristili mikrodilucijsku metodu određivši MIK, a oba uzorka su uspješnije inhibirala gram-pozitivne bakterije uz bolji učinak propolisa pčela vrste *M. quadrifasciata*. Europski propolis, također, bolje djeluje na gram-pozitivne bakterije. GRANGE i DAVEY (1990.) su ispitivali 21 bakterijski soj izoliran u bolničkim uvjetima, a među ispitivanim sojevima su bile gram-pozitivne bakterije: *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* sp., *Bacillus cereus*, *Mycobacterium tuberculosis* i gram-negativne bakterije: *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* i *K. pneumoniae*. Etanolni ekstrakt topola tipa propolisa je bolje djelovao na gram-pozitivne bakterije, gram-negativne bakterije je u većini slučajeva djelomično inhibirao, a na *K. pneumoniae* nije djelovao. Jedan od glavnih uzroka slabijeg djelovanja propolisa na pojedine vrste gram-negativnih bakterija se krije u građi njihove vanjske membrane. Građa vanjske membrane gram-negativnih, a posebno sustav porina i lipopolisaharida, ovisi o vrsti bakterije. Također, neke vrste bakterija posjeduju enzime poput hidrolitičkih enzima koji mogu uništiti nestabilne, ali visoko djelotvorne sastavnice propolisa. Nakon njihove inaktivacije, propolis i dalje sadrži mnogo aktivnih tvari, no one nisu dovoljno djelotvorne za baktericidan učinak kod ovih bakterija (MIRZOEVA i sur., 1997.; SFORCIN, 2016.).

Do sada nije objavljeno puno rezultata istraživanja koji uključuju utjecaj propolisa na anaerobne bakterije. BOYANOVA i suradnici (2006.) su disk difuzijskom metodom ispitivali djelovanje bugarskog topola tipa propolisa na 94 klinički izolirana, anaerobna, bakterijska izolata. Bugarski propolis inhibirao je rast više od 89 % testiranih sojeva rodova *Clostridium*, *Bacteroides* i *Propionibacterium*. Ipak 15 % sojeva bakterija roda *Clostridium*, 3,3 % sojeva gram-pozitivnih bakterija i 9,1 % sojeva gram-negativnih bakterija nije bilo inhibirano. Neki od autora ispitivali su utjecaj propolisa na anaerobne oralne patogene. SHABBIR i suradnici (2016.) su zaključili da je pakistanski propolis učinkovit protiv pigmentiranih, anaerobnih, periodontalnih patogenih mikroorganizama bez razvoja rezistencije. Ispitivane bakterije su bile rezistentne na tetraciklinske antibiotike, no na uzorke propolisa su bile potpuno osjetljive. Zbog

većeg prinosa ekstrakta i uštede vremena potrebnog za ekstrakciju, autori su preporučili UAE umjesto maceracije pri dobivanju ekstrakata. Istraživanje skupine autora iz Turske također je bilo potaknuto rezistencijom oralnih patogenih mikroorganizama. Autori su ispitivali četiri uzorka propolisa koji potječu s brazilskog i turskog područja. Uz učinkovitost su odredili i koje je razdoblje izloženosti bakterija propolisu potreban za njihovo suzbijanje. Smrt bakterija vrste *Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptostreptococcus micros*, *Lactobacillus acidophilus* i *Actinomyces naeslundii* nastupila je nakon 4 sata, vrste *Prevotella oralis*, *Prevotella melaninogenica* i *Porphyromonas gingivalis* nakon 8 sati, vrste *Fusobacterium nucleatum* nakon 12 sati te vrste *Veillonella parvula* nakon 16 sati inkubacije i izloženosti propolisu. Sve ispitivane vrste bakterija su bile osjetljive na uzorke propolisa, a turski propolis je bio učinkovitiji od brazilskog (KORU i sur., 2007.).

Uzorci propolisa se u manjoj ili većoj mjeri razlikuju, a posebno su vidljive značajne razlike u sastavu i količini aktivnih tvari propolisa drukčijeg klimatskog podneblja. Bez obzira na to radi li se o uzorku iz umjerenog klimatskog područja ili iz tropskog područja svi ispitivani uzorci su bili do određene razine učinkoviti. KUJUMGIEV i suradnici (1999.) su ispitivali antibakterijsku, antimikotičku i antivirusnu učinkovitost propolisa tropske i umjerene klime. Svi ispitivani uzorci su pokazali antibakterijsko djelovanje protiv bakterija *S. aureus* i *E. coli*, antimikotičko djelovanje protiv gljivice *C. albicans* te je većina uzoraka bila učinkovita protiv virusa ptičje influence. Iz navedenog se može zaključiti da su različite kombinacije aktivnih tvari esencijalne za biološku aktivnost propolisa (CHRISTOV i sur., 1999.).

Polifenoli su jedna od najčešće spominjanih skupina spojeva koji se nalaze u propolisu. Jedna od većih podskupina unutar skupine polifenola su flavonoidi za koje je dokazano da imaju antibakterijski, antimikotički i antivirusni učinak. Neki od flavonoidnih spojeva koji se nalaze u propolisu, a imaju antibakterijski učinak su galangin, pinocembrin, apigenin, kvercetin i kampferol. Zanimljivo je da niti jedan flavonoid zasebno nije postigao značajniji antibakterijski učinak od učinka cjelovitog ekstrakta, stoga POPOVA i suradnici (2007.) predlažu da se pri standardizaciji i određivanju kvalitete propolisa umjesto mjerenja koncentracije zasebnih sastavnica trebaju izmjeriti ukupne koncentracije pojedinih skupina spojeva. Također, dokazano je i da su vrlo maleni udjeli flavonoida kod europskog propolisa dovoljni da on bude antimikrobno aktivan (KOSTALEC i sur., 2005.). Ova opažanja potvrđuju važnost sinergizma flavonoida s drugim spojevima, kako s ostalim flavonoidnim spojevima, tako i s drugim skupinama spojeva i kemoterapeuticima (CUSHNIE i LAMB, 2005.; BONVEHI i sur., 1994.).

Dok su u europskom propolisu najzastupljenije aktivne tvari flavonoidi i derivati kavene kiseline, u tropskom propolisu su najzastupljenije fenolne kiseline i prenilirani derivati. Pri istraživanju više tipova brazilskog propolisa su među važnijim spojevima izolirani p-kumarinska kiselina, benzojeva kiselina, kavena kiselina i njezini derivati te hidroksicinamična kiselina i njezini prenilirani derivati. Većina izoliranih spojeva bili su fenoli ili fenolne kiseline, a flavonoidi kao što su pinobaksin, krisin i kampferol utvrđeni su u samo nekoliko uzoraka. Od svih ispitivanih uzoraka antimikrobno je najaktivniji bio crveni brazilski propolis iz kojeg su izolirani jednostavni fenoli, triterpenoidi, izoflavonoidi, prenilirani beznofenoni i naftokinin epoksid. U ovom istraživanju opažena je pozitivna korelacija između antibakterijske aktivnosti i količine navedenih tvari, posebno fenola, u ekstraktima (SALOMÃO i sur., 2008.; DA SILVA i sur., 2006.). Do sada navedene vrste propolisa prikupljaju medonosne pčele, ali i propolis pčela bez žalca ima vrlo vrijedna svojstva, iako se sastavom poprilično razlikuje od propolisa medonosnih pčela. Propolis pčela roda *Melipona* za razliku od drugih vrsta propolisa oskudijeva flavonoidima, no obiluje benzofenonima koji se smatraju odgovornima za njegov antibakterijski učinak. Očekivano, ispitivani uzorci ove vrste propolisa bolje djeluju protiv gram-pozitivnih bakterija (*S. aureus*) nego protiv gram-negativnih bakterija (*E. coli* i *P. aeruginosa*) (DA CUNHA i sur., 2013.). Sastavnice propolisa, osim o vrsti pčela, ovise i o botaničkom sastavu pa se tako u propolisu drugih vrsta pčela roda *Melipona* mogu pronaći i prenilirani fenilpropanoidi zastupljeni u biljkama roda *Eucalyptus*, drukčiji spojevi flavonoida kao što su aromadendrin i naringenin, tanini, hidrolizabilni terpeni i dugolančane masne kiseline. Zbog raznolikosti spojeva, uzorci propolisa pčela roda *Melipona* su osim protiv gram-pozitivnih bakterija, donekle aktivni i protiv gram-negativnih bakterija (DOS SANTOS i sur. 2017.). Bez obzira na vrstu propolisa, uz navedene skupine spojeva antibakterijska svojstva imaju i drugi spojevi kao što su ostali terpeni, lignani i stilbeni, a nerijetko se razvojem novih metoda izoliraju i nove aktivne skupine spojeva (TRUSHEVA i sur., 2010.; PETROVA i sur., 2010.).

Na učinkovitost propolisa utječu i svojstva otapala ili odabrana metoda ekstrakcije. Svako otapalo ekstrahira različite tvari iz propolisa pa se tako neke skupine spojeva većinom ekstrahiraju korištenjem određenog otapala npr. voda može ekstrahirati škrobne sastavnice, polipeptide i lecitine, etanol sterole i poliacetilene, a eter kumarine i masne kiseline (COWAN, 1999.). Eksperimentalno su ispitani brojni ekstrakti propolisa dobiveni različitim otapalima te utjecaj pH na njihovu antibakterijsku aktivnost. IVANČAJIĆ i suradnici (2010.) su ispitali djelovanje ekstrakata propolisa dobivenih pomoću pet različitih otapala na 12 vrsta bakterija u



kiselom, neutralnom i lužnatom okruženju. Najbolji učinak na preko 90 % ispitivanih mikroorganizama (11/12) imali su uzorci propolisa ekstrahirani eterom, acetonom, toluolom i kloroformom, a u nekim slučajevima je bolja antimikrobna učinkovitost pokazana u blago kiselom okolišu (pH=6). Zbog jednostavnosti i niske cijene se pri ekstrakciji u najviše istraživanja koristi etanol pa se može zaključiti da se većina dobivenih rezultata može pripisati etanolnim ekstraktima. Veće količine masnih kiselina i voskova utječu na slabiju topljivost propolisa i ometaju ekstrakciju aktivnih tvari pa su se PARK i suradnici (2014.) dosjetili istražiti antimikrobnu aktivnost etanolnog ekstrakta kineskog propolisa nakon uklanjanja masnih kiselina iz uzoraka propolisa pomoću lipaza. Uklanjanje masnih kiselina povećalo je učinkovitost ekstrakcije flavonoida, a posljedično i antimikrobnu učinkovitost propolisa. Bez obzira na poboljšanje učinkovitosti ekstrakcije, ove pripremne metode nisu prikriale nedostatke korištenja etanola. Prisutnost gorkog i intenzivnog okusa te ograničenost primjene kod određenih pacijenata i bolesti zahtijevaju pronalazak alternativnih rješenja. KUBILIENE i suradnici (2015.) su ispitivali učinkovitost ekstrakata koji ne sadrže alkohol, a među ispitivanim svojstvima bila je i antimikrobna učinkovitost na predstavnike gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Razlike u udjelu ukupnih fenola iskazane su ekvivalentom koncentracije galne kiseline u mililitru (mg/ml GAE) etanolnog ekstrakta (uzorak I.), vodenog ekstrakta uz dodatak PEG-a (uzorak II.) i vodenog ekstrakta uz dodatak PEG-a i maslinovog ulja (uzorak III.). Ukupni udio fenola u uzorku I. bio je 12,7 mg/ml GAE, u uzorku II. 10,7 mg/ml GAE, a u uzorku III. 9,5 mg/ml GAE. Antibakterijska učinkovitost uzorka II. i uzorka III. bila je statistički značajna i za gram-pozitivne i za gram-negativne bakterije, a podjednaka ili veća od antibakterijske učinkovitosti etanolnog ekstrakta. Prema rezultatima ekstrakti izrađeni alternativnim otapalima bolje djeluju na gram-negativne bakterije nego etanolni ekstrakti. Prirodna uljna otapala, također, obećavaju kada je riječ o antibakterijskoj učinkovitosti. Za ekstrakciju indonezijskog propolisa pčela roda *Trigona* korišteno je kokosovo i maslinovo ulje, a antibakterijska aktivnost takvih ekstrakata je bila bolja od aktivnosti etanolnih ekstrakata (PUJIRAHAYU i sur., 2015.). Unaprjeđenja poznatih metoda i pronalazak novih metoda ekstrakcije ključni su za poboljšanje antibakterijske učinkovitosti ekstrakata.

U veterinarskoj medicini se navedena svojstva propolisa mogu uspješno primijeniti u kontroli i liječenju mastitisa *in vivo*. Propolis je siguran antimikrobni pripravak, za njegovu primjenu nije propisana karenca, a u većim dozama djeluje baktericidno i u mlijeku (ŠURAN i sur., 2020.). S obzirom na to da učinkovito djeluje protiv rezistentnih uzročnika mastitisa poput *S. aureus*, može se koristiti samostalno ili u kombinaciji s drugim antimikrobnim

pripravcima (SANTANA i sur., 2012.; KULKARNI i sur., 2013.). Također, područje primjene propolisa se svakodnevno širi razvojem novih formulacija i pripravaka za topikalnu primjenu pa su BALATA i suradnici (2014.) razvili nekoliko organogelova koji sadrže propolis za kožnu primjenu. Organogelovi su vrste gelova sastavljene od tekuće organske faze unutar trodimenzionalne mreže, a zbog svojstava ga se često koristi za primjenu lokalnu primjenu lijekova. Autori su *in vitro* testovima dokazali da je ovaj gel antimikrobno učinkovit i neškodljiv za kožnu primjenu te da bi se u budućnosti mogao koristiti za tretiranje infekcija rana i poticanje bržeg cijeljenja.

#### 2.4.1.1. Mehanizmi antibakterijskog djelovanja propolisa

Propolis na višestruke načine djeluje na patogene mikroorganizme, a njegove učinke dijelimo na izravne i neizravne. Njegov izravni učinak na bakterijske stanice vidljiv je u *in vitro* istraživanjima, a uz to *in vivo* propolis djeluje na poticanje imunološkog sustava i mehanizama uključenih u borbu s patogenim mikroorganizmima u tijelu (SFORCIN i BANKOVA, 2011.). PRZYBYLEK i KARPIŃSKI (2019.) su saželi djelovanje propolisa na pet glavnih mehanizama, a to su: povećanje permeabilnosti stanične membrane, smanjenje proizvodnje adenozin trifosfata (ATP-a), smanjenje bakterijske mobilnosti, ometanje membranskog potencijala i poticanje imunskog odgovora tijela. ALMUHAYAWI (2020.) je navedenim mehanizmima dodao inhibiciju sinteze nukleinskih kiselina, supresiju stvaranja biofilma, inhibiciju membranskih proteina i smanjenje bakterijske rezistencije.

Dio izravnih učinaka propolisa na bakterije proučavali su TAKAISI-KIKUNI i SCHILCHER (1994.) provođenjem analize djelovanja propolisa na bakteriju *Streptococcus agalactiae* koristeći mikrokolorimetrijske metode i elektronski mikroskop. Autori su uočili smanjenje optičke gustoće bakterija uz njihovu slabiju mogućnost obnavljanja i smanjenje gustoće proteina unutar i izvan bakterijske stanice. Također, dokazano je da propolis inhibira bakterijski rast prevencijom diobe stanice što rezultira stvaranjem pseudo-višestaničnih streptokoka. Osim toga, propolis je izazvao poremećaje u izgledu citoplazme, citoplazmatske membrane i stanične membrane uzrokujući bakteriolizu i inhibirajući sintezu proteina. Na osnovi toga je bilo jasno da je mehanizam djelovanja propolisa vrlo složen i da se propolis ne može svrstati niti u jednu skupinu antibiotika. Promjene u otpuštenoj toplini i bakterijskom rastu u odnosu na kontrolu dokazale su smanjenje metaboličke aktivnosti zbog primjene propolisa. Nadalje, prema MIRZOEVOJ i suradnicima (1997.) je glavni mehanizam sastavnica

propolisa povećanje propusnosti unutarnje bakterijske membrane za ione, a utjecaj je bio ispitivan na bakterijama *Rhodobacter sphaeroides*, *B. subtilis* i *E. coli*. Navedene promjene se događaju dužinom cijele membrane bakterijske stanice što poremećuje membranski potencijal i elektrokemijski gradijent protona koji je esencijalan za održavanje sinteze ATP-a, membranskog transporta i motiliteta. Kao što je ranije spomenuto, neke gram-negativne bakterije posjeduju razlike u građi vanjske membrane i hidrolitičke enzime koji mogu uništiti sastavnice propolisa pa je zato učinak propolisa bolji u suzbijanju gram-pozitivnih bakterija. Ispitivana je i moguća adaptacija bakterije *B. subtilis* na propolis. Zbog svojstava krivulje prilagodbe (lag krivulje) koja se nije skratila ni nakon više pasaža autori su zaključili da nije došlo do pojave rezistencije i bakterijske adaptacije. Također se povećanjem koncentracije propolisa ubrzava i povećava baktericidan učinak pa autori smatraju da propolis djeluje baktericidno, a ne bakteriostatski.

Antibakterijski mehanizam nekih flavonoida (kampferola, hesperitina, biohanina A i katehin hidrata) na model membrane *E. coli* je bio interakcija s hidrofilnom regijom fosfolipida stanične membrane i penetracija hidrofobne jezgre pri većim koncentracijama (HE i sur., 2014.). Osim toga flavonoidi djeluju i na inhibiciju enzima DNK giraze. DNK-giraza je bakterijski enzim iz skupine topoizomeraza tipa II koji cijepa veze između šećera i fosfata u oba lanca i tako onemogućuje njihovo pretjerano namotavanje (engl. *DNA supercoiling*). Ovaj enzim je često meta mnogih antibiotika, a na njega djeluju i flavonoidi. Od svih flavonoida najbolji učinak na ovaj enzim ima kvercetin koji ga inhibira dvama mehanizmima: interakcijom s DNK i vezanjem na mjesto gdje se veže ATP. Vezanje za podjedinicu enzima DNK giraze se događa zbog strukturalne sličnosti kvercetina i molekule ATP-a pa novonastali kompleks kvercetin-giraza uzrokuje inhibiciju ATP-azne aktivnost ovog enzima (WU i sur., 2013.; PLAPER i sur., 2003.). Moguće je da umjesto jednog specifičnog mjesta djelovanja pojedinačni flavonoidi imaju više meta u bakterijskoj stanici, a strukturalne značajke im pomažu da uđu u bakterijsku stanicu ili da joj se približe (CUSHNIE i LAMB, 2005.). Mehanizam djelovanja flavonoida je i inhibicija sinteze DNK i RNK. U jednom istraživanju su flavonoidi robinetin, mircetin i epigalokatehin inhibirali sintezu DNK bakterije *Proteus vulgaris* te sintezu RNK bakterije *S. aureus*. Osim sinteze nukleinskih kiselina, inhibirana je i sinteza proteina i lipida, ali u manjem obimu. Autori predlažu da B prsten flavonoida sudjeluje u interakciji s bazama DNK i RNK i tako ugrožava njihovu sintezu (MORI i sur., 1987.). Flavonoidi, osim navedenog, sudjeluju i u inhibiciji enzima odgovornih za sintezu masnih kiselina membrane bakterija (JEONG i sur., 2009.).

Mehanizmi antibakterijskog djelovanja proučavani su i na propolisu pčela rodova *Melipona* i *Tetragonisca*. TORRES i suradnici (2018.) mjerili su količinu dijelova stanice *E. coli* i *S. aureus* u izvanstaničnom matriksu. Najviše otpuštenih molekula bile su nukleinske kiseline što je potvrdilo razaranje bakterijske stijenke i oslobađanje intracelularnog materijala. Očigledno i ove vrste propolisa djeluju na bakterijsku stijenku, iako u svom sastavu ne sadrže velike količine flavonoida. Za njihovu aktivnost zaslužni su visoki udjeli drugih skupina aktivnih tvari poput hidrofobnih diterpena, kao što je totarol (MICOL i sur., 2001.). Osim narušavanja cjelovitosti stanice, totarol ima i svojstvo smanjenja staničnog disanja bakterije *S. aureus* za 70 % u samostalnoj primjeni. Kod njegove paralelne primjene s antibiotikom meticilinom (koji sadrži  $\beta$ -laktamski prsten) uočeno je smanjenje rezistencije bakterije *S. aureus* (MRSA). Totarol je djelujući na ekspresiju i funkciju proteinskog receptora 2a koji veže peniciline (engl. *penicillin-binding protein 2a*, PBP 2a) smanjio potrebnu minimalnu inhibicijsku koncentraciju (MIK) meticilina za zaustavljanje bakterijskog rasta (NICOLSON i sur., 1999.). U ovim vrstama propolisa se nalazi i artepilin C, prenilirani derivat p-kumarinske kiseline. Artepilin C je jedan od glavnih spojeva pronađenih u brazilskom zelenom propolisu. YOSHIMASU i suradnici (2018.) su istraživali antibakterijsko djelovanje brazilskog zelenog propolisa na bakteriju *P. gingivalis* koja je jedan od glavnih uzročnika periodontalnih bolesti. Dio tog istraživanja uključivao je i ispitivanje djelovanja izoliranog artepilina C koji je izazvao stvaranje mjehurića na membrani bakterijske stanice uočenih elektronskim mikroskopom. Antibakterijskom učinku artepilina C pomaže i njegov protuupalni učinak te biodostupnost nakon oralne primjene (PAULINO i sur., 2008.).

Na stvaranje biofilma utječe bakterijski međustanični sustav komunikacije nazvan kvorumaska svijest (engl. *quorum sensing*, QS) koji koriste gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, a temelji se na sekreciji i utvrđivanju vanjskih signalnih molekula u prisutnosti dovoljnog broja bakterija u okolini. Neke od sastavnica propolisa kao što su razni derivati cinamične kiseline, poput trans-cinamaldehyd, inhibiraju QS sustav i tako smanjuju stvaranje biofilma, a uz to inhibiraju ATP-aze i diobu bakterijskih stanica (VASCONCELOS i sur., 2018.). Stvaranje karijesa uzrokovano je kolonizacijom i nakupljanjem mikroorganizama usne šupljine i njihovih ekstracelularnih polisaharida koji tvore bakterijski biofilm. Između ostalog, bakterijski biofilm je sintetiziran i od saharoze pomoću više enzima glukoziltransferaze. Uočeno je da različiti ekstrakti propolisa inhibiraju taj enzim kod bakterije usne šupljine *S. mutans*, ali ne u jednakoj mjeri. Bolju inhibicijsku aktivnost pokazali su oni uzorci koji su sadržavali više flavonoida pinocembrina i galangina (PARK i sur., 1998.). Također, uočeno je

da su flavoni i flavonoli bolji inhibitori enzima glukoziltransferaze kad je on u otopljenom stanju, a od svih flavonoida pojedinačno je najbolji učinak apigenina (KOO i sur., 2002a.). Inhibitorska svojstva apigenina potvrđena su i *in vivo* (KOO i sur., 2002b.). Iako propolis pčela roda *Melipona* oskudijeva flavonoidima, obiluje benzofenonima koji uspješno zaustavljaju stvaranje biofilma bakterije *S. mutans* (DA CUNHA i sur., 2013.). Osim flavonoida i benzofenona, navedena su svojstva u novije vrijeme pripisana i esencijalnim uljima kineskog propolisa. Ova ulja inhibiraju enzime i stvaranje biofilma, a pri tom ne djeluju toksično na normalne epitelne stanice (YUAN i sur., 2022.).

Neizravno propolis djeluje na bakterijske stanice poticanjem imunskih stanica u tijelu, a poseban utjecaj ima na dendritične stanice čija je glavna uloga prezentiranje antigena T-limfocitima. Propolis je utjecao na aktivaciju dendritičnih stanica u prisutnosti bakterijskih lipopolisaharida poticanjem sinteze citokina i drugih medijatora upale kao što su čimbenik kappa B – nuklearni faktor (engl. *nuclear factor kappa B*, NF- $\kappa$ B), čimbenik tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor*, TNF) i razni interleukini poput interleukina 6 (IL-6) i interleukina 10 (IL-10). Nakon antigene simulacije dendritične stanice kontroliraju ekspresiju transmembranskih proteina poput *toll-like* receptora (TLR) i drugih molekula te tako povezuju početni upalni odgovor i adaptivnu imunost (CONTI i sur., 2016.). Osim na dendritične stanice, vodotopivi derivat propolisa djeluje i na alternativni i klasični sustav komplementa inhibirajući ih i mijenjajući tijek njihove reakcije. Navedeno je uočeno pojavom supresije hemolize posredovane aktivacijom sustava komplementa koja je bila povezana s vremenom i temperaturom uz opasku da su visoke koncentracije pripravka imale izravan učinak na oštećenje eritrocita (IVANOVSKA i sur., 1995a.). Nadalje, promatran je učinak kompleksa sastavnica propolisa cinamične kiseline i L-lizina na obrambene mehanizme miševa. Nakon trodnevne intraperitonealne aplikacije kompleksa iza koje je slijedila inokulacija *K. pneumoniae* opažena je veća proliferacija timusnih i slezenskih limfocita kao i oslobađanje veće količine IL-1 i IL-2 (IVANOVSKA i sur., 1995b.). U drugom istraživanju DIMOVA i suradnika (1991.) se oralnom i parenteralnom aplikacijom vodotopivog derivata propolisa povećala stopa preživljavanja kod eksperimentalnih infekcija bakterijama *K. pneumoniae* i *S. aureus*. Osim što je utjecao na povećanje stope preživljavanja, propolis je potaknuo peritonealne makrofage na proizvodnju IL-1. Tako je neizravno utjecao na povećanje ukupne sekrecije proteina. Zaštitno djelovanje propolisa protiv infekcije nakon aplikacije je trajalo do 30 dana, a prema mišljenju autora ostvareno je prvenstveno preko makrofaga. Drugi autori su ispitivali imunomodulacijsko djelovanje afričkog propolisa na peritonealne makrofage miševa.

Miševi su tretirani propolisom i žrtvovani, a stanice su *in vitro* simulirane interferonom gama (IFN-  $\gamma$ ) nakon čega su mjerene razine otpuštenog vodikovog peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i dušikovog oksida (NO) kao pokazatelji aktivacije peritonealnih makrofaga. Propolis je uzrokovao blago povišenje razine oslobođenog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i smanjivanje stvaranja NO što potvrđuje njegovo djelovanje na nespecifičnu imunost domaćina aktivacijom makrofaga (ORSI i sur., 2000.).

Osim navedenih izravnih i neizravnih mehanizama predloženi su i novi mehanizmi prema kojima sastavnice propolisa tvore fizičku barijeru koja sprječava mikroorganizmima da se priljube uz površine kao što je respiratorni epitel. Ovaj mehanizam se zasniva na prisutnosti elektrokinetičkih procesa i ovisi o funkcionalnim skupinama negativnog naboja brojnih sastavnica u propolisu. Na vlažnim površinama molekule se okrenu tako da s vodom tvore zonu isključenja koja odvaja koloidne čestice od površine. Koloidi su sve bakterije i svi virusi suspendirani u vodenom okolišu (npr. tjelesnim tekućinama) pa je ovo prva linija obrane od patogenih mikroorganizama. Ovaj zaključak otvara mogućnosti za novu vrstu primjene propolisa u obliku nazalnog spreja (KOWACZ i POLLACK, 2020.).

#### 2.4.1.2. Sinergijsko djelovanje propolisa

Sinergijska svojstva propolisa su, uz samostalne mehanizme djelovanja, vrlo bitna u njegovoj kliničkoj primjeni. Osim sinergije različitih aktivnih tvari unutar ekstrakta opažena su i sinergijska svojstva u primjeni s drugim ljekovitim pripravcima ili s antibioticima. AL-WAILI i suradnici (2012.) su istraživali međudjelovanje antimikrobnog učinka propolisa i meda na bakterije *S. aureus* i *E. coli* te na gljivicu *C. albicans* i opazili smanjenje minimalne inhibicijske koncentracije pri primjeni oba pripravka. OKSUZ i suradnici (2005.) su proučavali djelovanje propolisa i ciprofloksacina na keratitis uzrokovan bakterijom *S. aureus*. Iako su i propolis i ciprofloksacin samostalno dobro djelovali, njihovo kombiniranje imalo je najbolji učinak. ORSI i suradnici (2006.) promatrali su sinergijski učinak bugarskog i brazilskog propolisa uz antibiotike amoksicilin, ampicilin i cefaleksin. Zanimljivo je da je propolis umanjio rezistenciju bakterije *Salmonella enterica* i pokazao dobro sinergijsko djelovanje uz antibiotike koji djeluju na bakterijsku stijenku, a uzrok za to vjerojatno leži u djelovanju propolisa na bakterijsku stijenku (AL-ANI i sur., 2018.). Nadalje, dokazano je i sinergijsko djelovanje propolisa i antibiotika koji djeluju na ribosome kao što su kloramfenikol, tetraciklin i neomicin (ORSI i sur., 2012b.). U drugom istraživanju, sinergijski učinak pokazan je *in vitro*

primjenom propolisa uz amoksisilin i gentamicin. Minimalna inhibicijska koncentracija (MIK) i minimalna baktericidna koncentracija (MBC) antibiotika su bile značajno smanjenje kad se uz njih primijenio etanolni ekstrakt propolisa (WELLINGTON i sur., 2015.). Navedena istraživanja pokazuju da je istovremenom primjenom propolisa uz antibiotike moguće smanjiti terapijsku dozu i prevenirati bakterijsku rezistenciju. Ipak čini se da propolis ne djeluje sinergijski sa svim vrstama antibiotika pa je tako uočen nedostatak sinergijskog učinka s antibioticima koji djeluju na DNK kao što su ciprofloksacin i norfloksacin te s antibioticima koji djeluju na folnu kiselinu poput kotrimoksazola (ORSI i sur., 2012a.). Osim toga, MIRZOEVA i suradnici (1997.) smatraju da je u drugim istraživanjima sinergizam uočen pri korištenju velikih, toksičnih doza propolisa pa su oni proveli istraživanje s dozama manjim od bakteriostatskih i opazili samo blagi sinergistički učinak koji pripisuju aktivnim tvarima propolisa koje djeluju na povećanje bakterijske permeabilnosti i inhibiciju motiliteta.

#### 2.4.2. Antimikotički učinak propolisa

Antimikotičko djelovanje propolisa dokazano je u više znanstvenih radova, a najčešće je istraživano utjecaj propolisa na gljivice roda *Candida* koje su jedan od glavnih uzroka gljivičnih infekcija ljudi. Iako vrsta *C. albicans* slovi kao najčešće izolirana kod gljivičnih infekcija ljudi, zbog korištenja neselektivne terapije sve češće se izoliraju i druge vrste gljivica. TOBALDINI-VALERIO i suradnici (2016.) su ispitivali djelovanje brazilskog zelenog propolisa više vrsta roda *Candida* – *C. albicans*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis*. Osim što je propolis pokazao mikocidno djelovanje protiv navedenih gljivica, inhibirao je stvaranje novog i suzbio postojeći biofilm. Još jedno istraživanje djelovanja na gljivice roda *Candida* proveli su OTA i suradnici (2001.) na 80 uzoraka četiri vrste: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* i *C. guilliermondii*. Mikocidna aktivnost alkoholnog ekstrakta brazilskog propolisa bila je potvrđena za sve četiri vrste gljivica među kojima je *C. albicans* bila najosjetljivija, a *C. guilliermondii* najotpornija. Autori su mogući mehanizam djelovanja pripisali ranije opisanom mehanizmu inhibicije staničnog dijeljenja uočenom kod bakterija (TAKAISI-KIKUNI i SCHILCHER, 1994.). Nadalje, brazilski crveni propolis je imao negativan učinak na rast gljivice vrste *Candida musae*, a glavne aktivne tvari prisutne u ispitivanom propolisu bile su izoflavonoidi (DUDOIT i sur., 2020.). Osim na gljivice roda *Candida*, provedena su istraživanja djelovanja propolisa i na druge rodove, a posebno na uzročnike dermatofitoza. Argentinski znanstvenici AGÜERO i suradnici (2010.) ispitivali su djelovanje metanolnog

ekstrakta na više rodova i vrsta gljivica, plijesni i dermatofita među kojima su bile gljivice *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, plijesni *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* i *Aspergillus niger* te dermatofiti *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* i *Microsporum gypseum*. Zanimljivo je da su svi ekstrakti inhibirali rast gljivica i dermatofita, no plijesni roda *Aspergillus* nisu bile osjetljive. Najbolji učinak je bio ostvaren na mikroorganizme iz skupine dermatofita, a glavne sastavnice ispitivanog propolisa pripadale su skupinama kalkona i flavonodia. U istraživanjima je dokazano da uspješnost antimikotičkog djelovanja propolisa utječe i odabrana metoda ekstrakcije. BERRETTA i suradnici (2013.) su istraživali alternativne pripravke za liječenje vulvovaginalnih gljivičnih infekcija jer su rutinski korišteni polieni i azoli citotoksični te njihovo dugoročno korištenje ima brojne nuspojave. Istraživane formulacije propolisa bile su etanolni ekstrakt, vodeni ekstrakt, topivi suhi ekstrakt i matrične mikročestice propolisa. Etanolni ekstrakt propolisa je bio najučinkovitiji, a slijedili su ga vodeni ekstrakt, matrične mikročestice propolisa i vodotopivi suhi ekstrakt propolisa. Razlog za najbolju uspješnost etanolnog ekstrakta vjerojatno leži u manjem udjelu aktivnih tvari, poput artepilina C, dobivenih drugim postupcima ekstrakcije što zahtjeva poboljšanje alternativnih metoda. Detaljniji mehanizam antimikotičkog djelovanja ispitan je na više uzoraka gljivice *C. albicans*, a autori su došli do zaključka da se mikocidno djelovanje propolisa ostvaruje preko indukcije apoptoze i ometanja ekspresije gena uključenih u patogenezu, adheziju stanica, stvaranje biofilma i mijenjanje fenotipa gljivice (DE CASTRO i sur., 2013.).

### 2.4.3. Antiparazitski učinak propolisa

Nametničke bolesti su svakodnevno prisutne u veterinarskoj medicini, a u zemljama u razvoju predstavljaju veliki javnozdravstveni problem. Njihovo liječenje ponekad zna biti zahtjevno zbog široke rasprostranjenosti nametnika, specifičnosti njihovog životnog ciklusa i rastuće rezistencije pa su svi pomaci u smjeru pronalaženja novih pripravaka dobrodošli. Pčele se također suočavaju s nametničkim bolestima koje prijete njihovoj zajednici, a najbolja prirodna obrana je propolis. Uočeno je da se intenzitet prikupljanja smola biljaka i stvaranja propolisa povećava kad su zajednice izložene raznim stresorima poput nametničkih oboljenja pa je očigledno da im propolis pomaže u smanjivanju intenziteta nametničkih bolesti i infekcija (SIMONE-FINSTROM i SPIVAK, 2012.). Antiparazitska svojstva propolisa uočena su u istraživanjima intracelularnih i ekstracelularnih nametnika. Učinak različitih uzoraka libijskog



propolisa istraživani su na nekoliko Protozoa među kojima su bili *Trypanosoma brucei*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum* i *Crithidia fasciculata*. Svi su ispitivani uzorci propolisa *in vitro* bili do određene mjere učinkoviti (SIHERI i sur., 2016.). SILVA i suradnici (2017.) su promatrali učinak crvenog, zelenog i smeđeg brazilskog propolisa na južnoameričku vrstu *Trypanosoma cruzi*. U prvih 24 sata su svi ispitivani uzorci propolisa inhibirali njegovo umnožavanje, no samo je učinak crvenog brazilskog propolisa trajao duže od 96 sati. Dugotrajniji učinak crvenog brazilskog propolisa autori pripisuju visokom udjelu flavonoida. Nadalje, iranski znanstvenici su potaknuti povećanim interesom za suzbijanje malarije istražili utjecaj iranskog propolisa na vrste *Plasmodium berghe* i *P. falciparum*. Svi uzorci propolisa su bili djelotvorni *in vitro*, a iako nisu prevenirali smrtnost infestiranih miševa, produžili su im preživljavanje (AFROUZAN i sur., 2017.). Još jedno *in vivo* istraživanje proveli su NWEZE i suradnici (2017.) aplicirajući (intraperitonealno) metanolni ekstrakt nigerijskog crvenog propolisa Wistar štakorima pokusno inficiranima nametnikom *Trypanosoma brucei*. Štakori koji su tretirani većim dozama propolisa imali su manje nametnika u krvi, veći hematokrit, veće koncentracije hemoglobina i manje su gubili na masi, no nažalost nisu uspjeli preživjeti infekciju. Navedena istraživanja potvrđuju da iako propolis pokazuje dobru učinkovitost *in vitro*, *in vivo* njegova aplikacija ne uspijeva spriječiti mortalitet pokusnih životinja. Antiparazitsko djelovanje propolisa pripisuje se aktivnim tvarima kao što su fenoli i terpenoidi, a neki od mehanizama djelovanja uključuju razaranje stanice, poremećaj fosfolipidnog metabolizma, kondenzaciju citoplazme i oksidacijski stres (ZULHENDRI i sur., 2021.). Osim na nametnike carstva Protozoa, propolis djeluje i na razne vrste nametničkih crva. KISMET i suradnici (2006.) istraživali su utjecaj etanolnog ekstrakta propolisa na protoskolekse trakavice *Echinococcus granulosus*, a nakon inkubacije u trajanju od 3 minute nije bilo živih protoskoleksa. U drugom dijelu istraživanja propolis je apliciran štakorima intraperitonealno te nije izazvao nuspojave ili dodatne mortalitete. Metilji roda *Fasciola* spp. uzrokuju velike štete pri uzgoju preživača, stoga su HEGAZI i suradnici (2007a.) istraživali djelovanje etanolnog uzorka egipatskog propolisa na odrasle metilje vrste *Fasciola gigantica*. Nakon 24 sata izloženosti odraslog metilja propolisu uočena su oštećenja njegovih organa i formiranje mjehurića na površini vanjskog sloja nametnika, uz izobličenje siski. Ista skupina autora je egipatski propolis primijenila i na jajašca *F. gigantica* što je uzrokovalo njihov nepotpun razvoj i smrt, no morfološki elektronskim mikroskopom nisu uočene promjene na njihovoj ljusci (HEGAZI i sur., 2007b.). Ponekad propolis nije dovoljno učinkovit ako je samostalno primijenjen, no u kombinaciji s drugim pripravcima može poboljšati njihovo djelovanje. U *in vivo* istraživanju egipatski propolis nije samostalno uspio suzbiti nametnika *Schistosoma*

*mansoni*, iako su ispitivane životinje imale bolje biološke pokazatelje. No uz istovremenu primjenu prazikvantela i propolisa ostvareno je 98 %-tno smanjenje broja nametnika u usporedbi sa učinkom svakog od pripravaka pojedinačno (MAHMOUD i sur., 2014.). Brazilski zeleni propolis je samostalno imao bolji učinak od egipatskog propolisa pa je njegova primjena izazvala uginuće svih odraslih primjeraka *S. mansoni* nakon 24 sata pri većim dozama od 200 µg/ml, a učinkovite su bile i niže doze. Površinski sloj nametnika je bio oštećen, ljuštio se i na površini su bili formirani mjehurići (PAULA i sur., 2020.). Brazilski crveni propolis izazvao je potpuno smanjenje motiliteta *S. mansoni*, smanjenje ovipozicije i oštećenje nametničkog površinskog sloja, a kod miševa *in vivo* se broj nametnika smanjio za 61,3 % (SILVA i sur., 2021.). Učinak libijskog propolisa ispitan je i na nametničkim crvima vrsta *Trichinella spiralis* i *Caenorhabditis elegans*. Na *T. spiralis* je propolis imao osrednji učinak, dok je na *C. elegans* slabo djelovao (SIHERI i sur., 2019.).

#### 2.4.4. Antivirusni učinak propolisa

Posljednjih godina je zbog pandemije koronavirusa porastao interes za antivirusna svojstva propolisa, a osim na spomenuti virus propolis djeluje i na mnoštvo drugih vrsta virusa. Jedno od prvih istraživanja koje je uključivalo virusne čestice provedeno je 1990. godine, a ispitan je utjecaj pet flavonoida pronađenih u propolisu na infektivnost i umnažanje herpesvirusa, adenovirusa, koronavirusa i rotavirusa. Od svih virusa najosjetljiviji na flavonoide bili su herpesvirusi, a ostali virusi su inhibirani u puno većim dozama. Flavonoidi krisin i kampferol su uzrokovali smanjenje intracelularnog umnažanja herpesvirusa, no virusna infektivnost nije bila značajno smanjena. Kvercetin je smanjio infektivnost i umnažanje virusa samo pri velikim dozama, a akacetin i galangin nisu bili djelotvorni protiv niti jednog virusa (DEBIAGGI i sur., 1990.). Učinkovitost protiv herpesvirusa potvrdili su i drugi autori. Ekstrakti propolisa dobiveni različitim metodama ekstrakcije inhibirali su ispitivani herpes simplex virus tipa 1 (HSV-1) i herpes simplex virus tipa 2 (HSV-2), a glikolni ekstrakt propolisa imao je bolji učinak na oba virusa od uobičajenog lijeka aciklovira (DEMIR i sur., 2020.). Nadalje, BANKOVA i suradnici (2014a.) su ispitivali djelotvornost masti za topikalnu primjenu načinjene od pročišćenih ekstrakta kanadskog propolisa. Mast je nanošena na promjene jednoslojnih staničnih kultura goveđeg bubrega izazvane HSV-1 i HSV-2, a uklonjena je nakon isteka vremenskih razdoblja u trajanju od 15 do 120 minuta. Autori su opazili da pripravci

imaju virucidan učinak protiv oba virusa s tim da se on povećavao povećavanjem koncentracije propolisa i vremena adhezije sa stanicama. Prema istraživanju GEKKERA i suradnika (2005.) propolis je imao učinak i na virus humane imunodeficijencije tipa 1 (HIV-1) potičući CD4<sup>+</sup> limfocite na inhibiciju ulaska virusa u mikroglialne stanice, a i sinergistički je djelovao s inhibitorom reverzne transkriptaze zidovudinom koji se uobičajeno koristi pri liječenju infekcije. Osim navedenog, prema istraživanjima je izgledno da propolis djeluje i protiv respiratornih virusa. KUJUMGIEV i suradnici (1999.) su uz antibakterijski i antimikotički učinak istraživali i antivirusni učinak propolisa na virus ptičje influence. Uzorci propolisa različitih geografskih nalazišta su bili, u većini slučajeva, učinkoviti protiv ispitivanog virusa. Infektivnost virusa influence 2 (H3N2) je također uspješno smanjena primjenom sintetičkih sastavnica propolisa, a smanjena je i proizvodnja hemaglutinina u embrioniranom kokošjem jajetu (SERKEDJIEVA i sur., 1992.). Nadalje, četiri od trinaest brazilskih ekstrakata propolisa imalo je antivirusni učinak na virus influence A (H1N1). *In vitro* su ekstrakti smanjili virusni plak na inficiranim stanicama psećeg bubrega (MDCK), a *in vivo* su kod zaraženih miševa smanjili količine virusa u bronhoalveolarnoj lavaži pluća i produžili njihovo preživljavanje (SHIMIZU i sur., 2008.). Način na koji brazilski propolis sprječava infekcije dišnih puteva opisali su KWON i suradnici (2020.). Kampferol i p-kumarinska kiselina spriječili su ulaz humanog rinovirusa i njegovo umnažanje u HeLa stanicama. U novije vrijeme istraživana je utjecaj propolisa na dijelove virusa SARS-CoV-2. Ispitivan je utjecaj liposomalne formulacije egipatskog propolisa na proteazu virusa i na S1 podjedinicu *spike* proteina virusa. Autori su 3D prikazom predočili afinitet nekoliko flavonoida propolisa za vezanje s proteazama virusa i *spike* proteinom, a u usporedbi s lijekom remdesivirom liposomi propolisa su imali samo nekoliko posto manji utjecaj na virusno umnažanje (REFAAT i sur., 2021.). Većina autora predlaže korištenje propolisa za aditivno liječenje protiv virusnih oboljenja.

#### 2.4.5. Antioksidacijski učinak propolisa

Oksidacijski stres i proizvodnja slobodnih radikala kriju se u patogenezi brojnih bolesti pa su se nastojanja znanstvenika da pronađu pripravke koji bi poništavali učinke oksidacijskog stresa intenzivirala početkom ovog stoljeća. Navedeni spojevi sprječavaju oksidacijske procese u živom organizmu i uklanjaju slobodne radikale koji mogu uzrokovati oštećenja stanice i staničnu smrt. Pri dokazivanju antioksidacijskog učinka propolisa se često koriste spektrofotometrijske metode kao što su mjerenje sposobnosti redukcije 2,2-difenil-1-

pikrilhidrazila (engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*, DPPH) i redukcije željezova (III) iona –  $Fe^{3+}$  u reakciji s antioksidansom (engl. *ferric reducing antioxidant power*, FRAP) (SOMOGYI i sur., 2007.). Propolis je dobar prirodni izvor spojeva s antioksidacijskim svojstvima kao što su flavonoidi i fenolne kiseline. Antioksidacijska aktivnost flavonoida se temelji na nekoliko mehanizama među kojima su izravno vezanje slobodnih radikala, interakcija s NO, inhibicija ksantinske oksidaze i reperfuzijskih ozljeda, sprječavanje imobilizacije leukocita i degranulacije neutrofila te interakcija s ostalim enzimima (NIJVELDT i sur., 2001.). Autori SOCHA i suradnici (2015.) odredili su udjele fenolne kiseline i flavonoida propolisa različitih poljskih regija te njegovu antioksidacijsku aktivnost. Uočili su značajnu linearnu korelaciju između ukupnog udjela fenola i reducirajuće moći ekstrakata te između ukupnog udjela fenola i moći vezanja slobodnih radikala. Slično je uočeno i za ukupne udjele flavonoida.

Osim europskog propolisa i druge vrste propolisa imaju značajnu antioksidacijsku aktivnost. SILVA i suradnici (2017.) istraživali su antioksidacijski učinak ekstrakata zelenog, smeđeg i crvenog propolisa dobivenih maceracijom u etanolu i superkritičnom ekstrakcijom. Zaključili su da je antioksidacijska učinkovitost ekstrakata dobivenih objema metodama ovisila o koncentraciji, no etanolni ekstrakti su imali veću antioksidacijsku aktivnost. Najbolji antioksidacijski učinak imao je etanolni ekstrakt crvenog propolisa i to do 98 % maksimalnog učinka pri najvišim koncentracijama. ABU-MELLAL i suradnici (2012.) su usporedili antioksidacijsku aktivnost brazilskog zelenog propolisa i australskog propolisa bogatog stilbenima. Zaključili su da je vjerojatno veliki udio stilbena u australskom propolisu doprinio njegovoj boljoj antioksidacijskoj aktivnosti. Propolis pčela roda *Melipona* (*M. fasciculata* i *M. quadrifasciata*) je također pokazao dobru antioksidacijsku aktivnost. Ona je bila proporcionalna s ukupnim udjelom fenola i dominacijom elagične i galne kiseline za propolis vrste *M. fasciculata* te s ukupnim udjelom flavonoida aromadendrina i naringenina kod propolisa pčele *M. quadrifasciata* (BATISTA i sur., 2016.; DOS SANTOS i sur. 2017.). Redukcijska sposobnost ekstrakata propolisa da reduciraju metale i vežu slobodne radikale (DPPH i FRAP) ovisi o kemijskoj kompoziciji, koncentraciji propolisa i udjelu etanola odnosno vode u ekstraktima (COTTICA i sur., 2011.). Osim toga, prema istraživanju OKIŃCZYK i suradnika (2021.) čini se da i biljni profil ima veliki utjecaj na antioksidacijsku aktivnost propolisa pa je tako aktivnost propolisa topola tipa bila manja od aktivnosti propolisa podrijetla više vrsta biljaka kao što su topola, breza i jasen. Uz to i metoda ekstrakcije određuje antioksidacijsku aktivnost.

Nekoliko istraživanja je pokazalo da bolju antioksidacijsku aktivnost imaju vodeni ekstrakti propolisa u odnosu na etanolne ekstrakte, a vjeruje se da je za ovu pojavu zaslužan veći udio polifenola kod ovakvih ekstrakata (LASKAR i sur., 2010.; ROCHA i sur., 2013.). Ipak, u istraživanju turskog propolisa GECKILA i suradnika (2005.) su etanolni i vodeni ekstrakt bili različito aktivni pri vezanju slobodnih radikala i imali su različitu reducirajuću snagu. Etanolni ekstrakt propolisa je pokazao veću antioksidacijsku aktivnost od vodenog ekstrakta, no manju od sintetičkih antioksidanasa. Osim navedenih parametara istraživana je sposobnost ekstrakata za stvaranje stabilnih kelata metala (željeza), a aktivnost oba ekstrakta propolisa bila je usporediva s uobičajenim ligandom etilendiamintetraoctenom kiselinom (EDTA). Druge skupine autora zanimalo je antioksidacijsko djelovanje ekstrakata propolisa načinjenih alternativnim otapalima. KUBILIENE i suradnici (2018.) usporedili su svojstva vodenog ekstrakta, polietilen glikolnog vodenog ekstrakta i etanolnog ekstrakta propolisa. Udio fenolnih kiselina u vodenom i polietilen glikolnom vodenom ekstraktu bio je od 40 % do 42 %, a u alkoholnom samo 16 %. Svi ekstrakti pokazali su sličnu antioksidacijsku učinkovitost, a etanolni ekstrakt i ekstrakt s polietilen glikolom imali su bolji učinak na smanjivanje proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS) u mitohondrijima. ŠURAN i suradnici (2021b.) su ispitivali antioksidacijsku aktivnost dva ekstrakta: etanolnog ekstrakta propolisa i polietilen glikolnog (PEG 400) ekstrakta. Nije bilo značajnije razlike između ta dva ekstrakta u ukupnom udjelu fenola i u antioksidacijskoj učinkovitosti. Propolis kao mješavina spojeva *in vitro* inhibira stvaranje ROS-a djelujući preko molekularnih mehanizama kao što je transkripcijski čimbenik pod nazivom nuklearni čimbenik eritroid 2 povezan s čimbenikom 2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, NRF2) koji regulira obrambeni odgovor stanice na toksine i oksidacijski stres preko ekspresije gena uključenih u antioksidacijske procese (HE i sur., 2020.). U fiziološkom stanju se on nalazi u citoplazmi, a oksidacijski stres uzrokuje njegovu disocijaciju od proteina za koji je bio vezan i premještanje u jezgru stanice. U jezgri stanice se veže za čimbenik antioksidacijskog/elektrofilnog odgovora (engl. *antioxidant/electrophile response element*, ARE) koji je pojačivač ekspresije gena odgovornih za sintezu antioksidacijskih enzima (KOBAYASHI i YAMAMOTO, 2005.). Brazilski crveni i kineski propolis potiču povećano nakupljanje NRF2 proteina u jezgri što uz pojačivač ekspresije gena ARE potiče ekspresiju antioksidacijskih enzimskih gena (HOTTA i sur., 2020.; ZHANG i sur., 2016.). Na ovaj način propolis doprinosi borbi protiv oksidacijskog oštećenja stanica i njihovog genetskog materijala te može prevenirati razvoj brojnih bolesti kao što su tumorske bolesti, dijabetes i ateroskleroza.

#### 2.4.6. Antitumorski učinak propolisa

Za antitumorsko djelovanje propolisa zaslužne su različite skupine spojeva kao što su njegove polifenolne sastavnice. ORŠOLIĆ i suradnici (2004.) su proveli *in vivo* istraživanje učinka hrvatskog topola propolisa i njegovih sastavnica (kavene kiseline, CAPE i kvercetin) na smanjivanje broja plućnih tumorskih metastaza kod presađenog karcinoma mliječne žlijezde miševa. Plućne metastaze su potaknute intravenskom aplikacijom tumorskih stanica testiranim životinjama. U usporedbi s kontrolama, sastavnice propolisa su značajno smanjile broj tumorskih čvorića u plućima, a cjeloviti uzorak propolisa bio je učinkovitiji od njegovih pojedinačnih sastavnica. Autori su pretpostavili da je antitumorsko djelovanje propolisa posredovano aktivacijom makrofaga i njihovim otpuštanjem sekundarnih produkata kao što su čimbenik tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),  $H_2O_2$  i NO koji su uključeni u uništavanje stanica i inhibiciju sinteze DNK-a u ciljanim stanicama. Također, aplikacija propolisa, kavene kiseline i CAPE-a utjecala je na povećanje celularnosti i mase slezene što može biti izravno povezano s proizvodnjom makrofaga. Najveći stupanj apoptoze uočen je kod stanica karcinoma tretiranih kvercetinom nakon 3 sata i CAPE-om nakon 15 sati. Pretpostavlja se da kvercetin djeluje izravno citotoksično na ciljane stanice te da potiče njihovu nekrozu.

Uz europski propolis, kineski propolis i njegove aktivne tvari također imaju antitumorsku aktivnost. Glavna antitumorska sastavnica ovog propolisa je flavonoid krisin koji osim što pokazuje antioksidacijsko djelovanje ima i antiproliferativno djelovanje na stanice humanog karcinoma dojke (MDA-MB-231). Ipak, morfološke promjene karakteristične za smrt tumorskih stanica nisu uočene pa su autori pretpostavili da se supresija rasta stanica događa preko indukcije njihove diferencijacije. Djelovanje krisina ispitivano je i *in vivo* na imunodeficientnim mišjim modelima kojima je presađen ksenograft ljudskog tumora. Nakon oralne administracije krisina modelima, uočeno je značajno smanjenje veličine tumora. Mehanizam preko kojega krisin djeluje antitumorski je povezan s njegovim inhibicijskim učinkom na enzim histonsku deacetylazu 8 (HDAC8) koji je uključen u diobu, metastaziranje i otpornost tumorskih stanica na lijekove (SUN i sur., 2012.).

Transmisivni venerični tumor (TVT) je prenosiva neoplazija kanida s mogućnošću regresije, no uobičajeno se liječi kemoterapijom. Skupina znanstvenika ispitala je učinak brazilskog propolisa na stanice ovog tumora koje su bile podijeljene u tri skupine: TVT limfocitnog izgleda, TVT plazmocitnog izgleda i mješoviti TVT. Ispitivani uzorak propolisa bio je učinkovit protiv svih navedenih stanica uključujući i TVT plazmocitnog izgleda koji se

smatra najmalignijim oblikom. Glavni izolirani spojevi iz brazilskog propolisa bili su aromatske kiseline (ferulična, dihidrocinamična, kavena i p-kumarinska), prenilirni spojevi p-kumarinske kiseline, esencijalna ulja i terpeni, a flavonoidi su bili prisutni u malenim količinama što je karakteristično za brazilski propolis. Navedeno istraživanje je otvorilo mogućnost primjene propolisa u kombinaciji s kemoterapijom za liječenje TVT-a (BASSANI-SILVA i sur., 2007.). U brazilskom propolisu se nalaze i velike količine ranije spomenute fenolne kiseline, artepilina C, koji između ostalog inhibira tumorski potaknutu angiogenezu. Artepilin C je značajno inhibirao tumorsku angiogenezu na mišjim modelima u usporedbi s netretiranom skupinom, a *in vitro* je utjecao na inhibiciju stvaranja tubula endotelnih stanica ljudske pupčane vene (AHN i sur., 2007.).

Osim izravnog antitumorskog učinka, propolis na tumorske stanice djeluje i posredno preko drugih imunskih stanica. Otpor spontanom formiranju tumora se često povezuje s imunskim stanicama kao što su stanice prirodne ubojice (engl. *natural killer cells*, NK). One su posebna vrsta limfocita različitih od T i B limfocita, a smatraju se stanicama primarnog imunskog odgovora. Ove stanice djeluju razgrađujuće na nekoliko vrsta tumora i stanica koje su inficirane virusima. U istraživanju SFORCINA i suradnika (2002.) analiziran je utjecaj sezonalnosti brazilskog propolisa na citotoksičnu aktivnost NK stanica miševa prema stanicama mišjeg limfoma (Yac-1). Propolis je kroz tri dana oralno apliciran miševima čija je slezena kasnije poslužila kao izvor NK stanica. Autori su izmjerili porast aktivnosti NK stanica koji nije ovisio o godišnjem dobu i sezoni u kojoj je propolis prikupljan. Bez obzira na činjenicu da se mehanizam kojim propolis djeluje na NK stanice ne zna, pretpostavlja se da je povezan s poticanjem proizvodnje citokina u peritonealnim makrofagima miševa koji zatim djeluju na povećanje citotoksične aktivnosti NK stanica.

Zaštitno djelovanje propolisa istraživano je na razvoju karcinoma debelog crijeva kod štakora. Štakorima je tijekom dva tjedna supkutano apliciran 1,2-dimetilhidrazin (DMH) koji se koristi za oštećenje DNK i izazivanje žarišnih promjena debelog crijeva koje se smatraju inicijalnim koracima u razvoju karcinoma. Ispitivanim životinjama su aplicirane različite doze etanolnog ekstrakta brazilskog propolisa istovremeno ili nakon DMH tretmana. Kod životinja kojima je propolis apliciran istovremeno uz DMH, nije uočen zaštitni učinak. Ipak, kod onih životinja kojima su aplicirane srednje doze propolisa tijekom 2 tjedna nakon DMH tretmana uočen je značajno manji broj promjena. S obzirom na to da DMH treba biti metaboliziran kako bi utjecao na stvaranje karcinoma, izgledno je da propolis ne utječe na njegov metabolički put. Također, alkohol dokazano povećava broj promjena pa kod uzoraka većih koncentracija utjecaj

alkohola može prevladati pozitivne učinke propolisa što objašnjava najbolje djelovanje srednjih koncentracija. Propolis je izravno utjecao na smanjenje proširenja kripti u debelom crijevu, no vjerojatno nema zaštitni utjecaj na pokretanje karcinogeneze (BAZO i sur., 2002.). Zbog utjecaja alkoholnog otapala na rezultate, DE LIMA i suradnici (2005.) su proveli slično istraživanje koristeći vodeni ekstrakt brazilskog propolisa. Autori su uočili značajan učinak propolisa na sprječavanje oštećenja DNK-a uzrokovanog DMH tretmanom ako je propolis apliciran istovremeno uz DMH. Međutim, i sam propolis u velikim koncentracijama uzrokuje oštećenje DNK-a. Uz navedeno, nije bilo značajnog učinka na smanjenje broja promijenjenih žarišta debelog crijeva. Ove razlike objašnjene su razlikama u sastavu propolisa koji je korišten 2002. godine i propolisa iz istraživanja 2005. godine. Brazilski propolis iz 2002. godine bogat je fenolnim sastavnicama, terpenima i esencijalnim uljima, a uzorak iz 2005. godine sadrži prenilirane derivate p-kumarinske kiseline, p-kumarinsku kiselinu i kavenu kiselinu. Iako mehanizmi djelovanja još nisu potpuno razjašnjeni, međudjelovanje različitih sastavnica propolisa na mutagene i karcinogene puteve ili njihova antioksidacijska aktivnost mogu biti uzrok razlika u rezultatima istraživanja. Uzevši navedeno u obzir se može zaključiti da propolis ima antitumorski potencijal, no potrebno je njegovo daljnje istraživanje i standardizacija učinkovitih doza koje ne izazivaju neželjene učinke.

#### 2.4.7. Ostali imunosno posredovani učinci propolisa

Mnoštvo ranije spomenutih učinaka propolisa, uz njegov izravan učinak uključuje i djelovanje propolisa posredovano imunosnim stanicama. Imunosni sustav je glavni sustav obrane organizma od oštećenja, a većina procesa počinje akutnom upalnom reakcijom. Upalna reakcija je reakcija živog tkiva na ozljedu u cilju uklanjanja uzročnika i zacjeljivanja oštećenja. U osnovi riječ je o vrlo važnom mehanizmu. Ipak, za vrijeme trajanja upale javljaju se neželjene reakcije kao što je bol, otok i smanjenje funkcije tkiva pa je uputno smanjiti upalu koristeći se tvarima s protuupalnim djelovanjem. Jedan od prirodnih pripravaka s protuupalnim djelovanjem je i propolis. Propolis ima protuupalni utjecaj na lipopolisaharidima potaknutu autofagiju endotelih stanica pupčane vene u *in vitro* uvjetima bogatim nutrijentima. XUAN i suradnici (2018.) su utvrdili učinak kineskog propolisa na smanjenje citotoksičnosti uzrokovane lipopolisaharidima, smanjenje proizvodnje ROS-a i zaštitu mitohondrijske membrane. Posljedično je smanjena i autofagija koja može biti potaknuta bakterijskim lipopolisaharidima i oštećenjima.



HU i suradnici (2005.) su ispitivali djelovanje etanolnog i vodenog ekstrakta kineskog propolisa na smanjenje akutne upale kod pokusnih Whistar štakora. Modelima je izazvana upala šapa, artritis, upala poplućnice i pluća te je mjerena transudacija kapilarnih žila prsnog koša. U odnosu na kontrolne skupine, životinje kojima je nakon izazivanja oštećenja apliciran vodeni ili etanolni ekstrakt propolisa imale su značajno blaži upalni odgovor, a mehanizam protuupalnog djelovanja propolisa je uključivao snižavanje razine prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) i NO. Kod modela artritisa ekstrakti propolisa su inhibirali porast razina IL-6 u tkivu, ali nisu imali učinak na IL-2 i IFN- $\gamma$  zbog čega su autori zaključili da je propolis supresivno djelovao samo na sekreciju mononuklearnih makrofaga (IL-6), bez učinka na T-limfocite (IL-2, IFN- $\gamma$ ). Međutim, u nekim istraživanjima propolis je poticao aktivnost makrofaga kao u slučaju ranije spomenute aktivacije peritonealnih makrofaga i njihove proizvodnje IL-1 (DIMOV i sur., 1991.). Osim izravnog učinka, djelovao je i neizravno na povećanje migracije i širenje rasprostranjenosti makrofaga. Makrofagi su stanice koje se smatraju prvom linijom obrane u većini tkiva, a njihova povećana migracija i rasprostranjivanje u krvotoku predstavljaju ključne korake prije nego što će napustiti krvožilni sustav i ući u oštećena tkiva. TATEFUJI i suradnici (1996.) ispitivali su učinak brazilskog propolisa i njegovih sastavnica na migraciju makrofaga i njihovo šire rasprostranjivanje. Zaključak ovog istraživanja bio je da ispitivane sastavnice brazilskog propolisa djeluju na pojačavanje migracije i širenje rasprostranjenosti makrofaga.

Autori ranijih istraživanja kao što su DIMOV i suradnici (1991.) smatrali su da propolis nema učinak na proliferaciju limfocita nego da isključivo djeluje na makrofage. Međutim, IVANOVSKA i suradnici (1995b.) su nakon trodnevne intraperitonealne aplikacije cinamične kiseline (zastupljene u propolisu) i L-lizina uz inokulaciju *K. pneumoniae* opazili veći stupanj proliferacije timusnih i slezenskih limfocita. Bez obzira na navedeno, drukčije su rezultate predstavili SÁ-NUNES i suradnici (2003.). U njihovom istraživanju istraživani su utjecaji propolisa na proliferaciju limfocita *in vitro* uz prisustvo mitogena konkanavalina A. Propolis je djelovao supresivno na proliferaciju limfocita uz prisutnost mitogena i bez njega. Ovi rezultati su različiti od rezultata IVANOVSKA i suradnika (1995b.) jer je udio kavene kiseline u propolisu vrlo mali (3 %) u odnosu na udio flavonoida za koje je dokazano supresivno djelovanje. Također, nije uočen izravan utjecaj propolisa na proizvodnju IFN- $\gamma$  u makrofagima, no kod stanica slezene potaknutih mitogenom uočeno je oslobađanje značajno veće količine IFN- $\gamma$  koje je posljedično smanjilo proizvodnju limfocita. ANSORGE i suradnici (2003.) su proučavali učinak različitih ekstrakata propolisa, flavonoida i CAPE-a na imunosne stanice i proizvodnju citokina mitogenom aktiviranih mononuklearnih stanica i pročišćenih T-

limfocita. Propolis je supresivno djelovao na sintezu DNK mononuklearnih stanica i T-limfocita te na proizvodnju citokina monocita i interleukina (IL-2, IL-4) u limfocitima čime je pokazao svoje protuupalno djelovanje. DANTAS i suradnici (2006.) su proučavali utjecaj etanolnog ekstrakta bugarskog propolisa na infekciju pokusnih miševa nametnikom *T. cruzi*. Osim što je pokazao antiparazitski učinak, promijenio je i tijek upalnog odgovora. Masa slezene kod tretiranih životinja je bila manja, a uočena je i supresija porasta zastupljenosti većine efektorskih i memorijskih limfocita u krvotoku zbog čega su autori zaključili da propolis inhibira diferencijaciju i razvoj T-limfocita. Imunosupresivan učinak propolisa mogao bi se primijeniti i u liječenju autoimunih bolesti kao što je multipla skleroza. Multipla skleroza je autoimuna bolest centralnog živčanog sustava koja je karakterizirana demijelinizacijom i prekidom signala koji dovodi do neuroloških posljedica. Patogeneza ove bolesti vezana je uz limfocite jer su i CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> pronađeni u lezijama ove bolesti. Kod pacijenata s recidivom ove bolesti je u cerebrospinalnom likvoru izmjerena povećana koncentracija proupalnih citokina. Propolis i njegove sastavnice kao što je CAPE, utjecali su na inhibiciju proliferacije, usmjeravanje diferencijacije i smanjenje aktivacije T-limfocita pa je u istraživanju ZHOU i suradnika (2020.) profilaktičko liječenje mišjih modela CAPE-om iz propolisa uzrokovalo značajno smanjenje incidencije i ozbiljnosti ove bolesti.

Opisan je i učinak propolisa na stvaranje antitijela. SCHELLER i suradnici (1988.) proučavali su učinak etanolnog ekstrakta propolisa na stvaranje antitijela koji se očituje vidljivim plakom na stanicama slezene imuniziranih miševa. Autori smatraju da je intrapritonealno apliciran propolis potaknuo aktivaciju makrofaga što je preko proizvodnje citokina reguliralo funkciju B i T-limfocita, a učinak na proizvodnju antitijela bio je kratkotrajan. Nadalje, SFORCIN i suradnici (2005.) su istraživali imunomodulacijski učinak brazilskog i bugarskog propolisa na proizvodnju antitijela kod štakora imuniziranih goveđim serumskim albuminom (engl. *bovine serum albumin*, BSA). Zaključili su da je propolis potaknuo proizvodnju antitijela neovisno o godišnjem dobu i geografskom nalazištu, a niti jedna istraživana sastavnica zasebno nije imala učinak na tvorbu antitijela kao cjeloviti ekstrakt. Uočen je i učinak propolisa na pojačavanje imunskog odgovora na standardna cjepiva pa je tako istraživani utjecaj propolisa na imunski odgovor miševa imuniziranih cjepivom protiv svinjskog herpesvirusa tipa 1 (SuHV-1). Standardnim se cjepivima najčešće dodaju adjuvanti kako bi se pojačao imunski odgovor, a u ovom je slučaju cjepivu dodan aluminijev hidroksid. Istovremena aplikacija zelenog propolisa i cjepiva protiv SuHV-1 nije imala učinak na porast razine titra antitijela, no opažen je pojačani stanični imunski odgovor.

Međutim, aplikacija cjepiva, aluminijevog hidroksida i propolisa imala je bolji učinak na proizvodnju antitijela u usporedbi s aplikacijom cjepiva i adjuvanta bez propolisa. Ovo istraživanje otvorilo je brojne mogućnosti primjene propolisa kao pojačivača imunskog odgovora (FISCHER i sur., 2007.).

Ranije nabrojani učinci propolisa posredno pospješuju cijeljenje rana, a njegov izravan učinak bio je predmet istraživanja. ROMANA-SOUZA i suradnici (2018.) ispitivali su djelovanje CAPE-a izoliranog iz propolisa na ulkuse nastale pritiskom. Kod nagnječenih ozljeda ishemija i reperfuzija dovode do sinteze ROS-a i posljedične proizvodnje NO i ostalih medijatora upale. Upalni medijatori pridonose nastanku kronične upale koja onemogućava cijeljenje nastalih ulkusa. Nagnječenje je kod pokusnih miševa izazvano u dva ciklusa korištenjem pritiska dva magneta na leđni kožni nabor. Nakon zadnjeg ciklusa životinjama je intraperitonealno apliciran CAPE. U odnosu na kontrolu, životinje kojima je apliciran CAPE su u početku imale pojačanu sintezu medijatora upale kao što su NO i NF- $\kappa$ B, pojačanu lipidnu peroksidaciju i povećanu migraciju makrofaga, no sedam dana nakon ozlijede su ovi parametri bili sniženi. Osim toga, u početku je uočena povećana gustoća miofibroblasta koja je nakon 12 dana bila manja u odnosu na kontrolnu skupinu. Aplikacija CAPE-a potaknula je odlaganje kolagena i reepitelizaciju ulkusa 12 dana nakon ulceracije. Navedeni rezultati naveli su autore da zaključe da je CAPE ubrzao upalni odgovor i oksidativne ozlijede, ali i promovirao rekonstrukciju kože i zatvaranje ulkusa nastalih nagnječenjem. Osim na rane nastale nagnječenjem, propolis je djelovao i na opekline kod pokusnih životinja. Metaboličke bolesti kao što je dijabetes utječu na smanjenje učinkovitosti zarastanja rana. Dijabetes i visoke razine glukoze u krvi inhibiraju aktivnost bijelih krvnih stanica koje su zaslužne za imunski odgovor, smanjuju lučenje hormona koji pomažu pri cijeljenju, a utječu i na smanjenje cirkulacije pacijenata. AHMED i suradnici (2011.) ispitivali su učinak egipatskog propolisa na opekline albino štakora s dijabetesom tipa 1. Pokusne životinje su podijeljene u četiri skupine: skupini 1 je na opeklinu topikalno primijenjena krema od egipatskog propolisa, skupini 2 dermazin krema (srebrni sulfadiazin), skupini 3 mješavina propolisa i dermazin kreme u jednakim omjerima te je skupina 4 bila kontrolna skupina kojoj je na opeklinu aplicirana fiziološka otopina (0,9 % NaCl). Kod svih tretiranih skupina je uočeno smanjenje opekline i broja bakterijskih kolonija na rani u odnosu na kontrolnu skupinu. Krema od propolisa je bila učinkovitija od dermazin kreme, a najveća učinkovitost je postignuta aplikacijom mješavine propolisa i dermazin kreme.

Uz brojne druge učinke, propolis je djelovao zaštitno na organe i organske sustave smanjujući stupanj oštećenja pogođenih organa, a najčešće je istraživao njegov utjecaj na jetru. HERMENEAN i suradnici (2017.) su ispitali utjecaj krisina na kemijski potaknuto akutno oštećenje jetre *in vivo*. Miševima je kroz sedam dana oralno aplikiran krisin, a nakon toga je intraperitonealnom aplikacijom ugljikovog tetraklorida (CCl<sub>4</sub>) izazvano akutno oštećenje jetre. Pozitivna kontrolna skupina je dobivala silimarin koji se inače koristi za liječenje jetrenih bolesti. Dan nakon nastalog oštećenja porasle su razine serumske aspartat aminotransferaze (AST) i alanin amnotransferaze (ALT) te je uočena proširena centrolobularna nekroza i steatoza. Akutna hepatotoksičnost bila je povezana s porastom jetrenog čimbenika TNF- $\alpha$  i ekspresijom  $\alpha$ -aktina glatkih mišića (engl.  *$\alpha$ -smooth muscle actin*,  $\alpha$ -SMA) koji su kod skupina tretiranih krisinom i silimarinom bili značajno smanjeni. Osim toga, razine AST-a i ALT-a u serumu i patohistološke promjene su također bile manje kod životinja tretiranih krisinom. Krisin je blokirao aktivnost TNF- $\alpha$  konvertirajućeg enzima i smanjio razine TNF- $\alpha$ . Zaštitno djelovanje propolisa ispitivano je i na nikotinom izazvanom oštećenju pluća i jetre štakora. U ovom slučaju propolis je pokazao zaštitan učinak na tkivo pluća i jetre koji je ovisio o dozi propolisa, a mehanizmi ovakvog djelovanja propolisa su povezani s njegovim antioksidacijskim i protuupalnim učinkom (KHALED i sur., 2021.).

U rijetkim slučajevima propolis u većim koncentracijama može izazvati alergijske reakcije ili kontaktni dermatitis kod osjetljivih jedinki. ORSI i suradnici (2005.) su proučavali učinak etanolnog ekstrakta propolisa na suspenziju plućnih stanica zamorčića. Mjerenjem količine otpuštenog histamina procijenjen je utjecaj propolisa na mastocite koji su se nalazili u suspenziji. Autori su zaključili da su veće koncentracije ekstrakta (300 mg/ml) citotoksično utjecale na mastocite i prouzrokovale značajno povećanje količine otpuštenog histamina, dok niže koncentracije propolisa nisu imale takav učinak. Pretpostavlja se da ovaj tijek odgovara tijeku alergijske reakcije ljudi osjetljivih na propolis, a on izravno djeluje na mastocite uzrokujući otpuštanje upalnih citokina. Međutim, učinak propolisa i njegovih sastavnica može i pozitivno djelovati na supresiju alergijskih reakcija i bolesti kao što su astma, sinusitis i atopijski dermatitis. KIM i suradnici (2013.) istraživali su antialergijski učinak galangina koristeći *in vitro* i *in vivo* modele. Galangin je inhibirao otpuštanje histamina iz mastocita i smanjio ekspresiju proupalnih citokina kao što su TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  i IL-8 *in vitro*. Osim toga, *in vivo* je galangin oslabio imunoglobulinom E (IgE) posredovan pasivni, anafilaktički, kožni odgovor i ekspresiju histaminskih receptora u upaljenom tkivu. Učinak galangina bio je bolji od nekih uobičajenih antialergijskih lijekova. Osim galangina, krisin, kampferol i njihovi

derivati su u drugim istraživanjima pokazali najbolji antialergijski učinak. NAKAMURA i suradnici (2010.) su uspoređivali antialergijski učinak brazilskog i kineskog propolisa, a kineski propolis je zbog veće količine kampferola i krisina imao bolji učinak na supresiju alergijske reakcije tipa 1. Nadalje, kliničko istraživanje primjene mliječnog dodatka s propolisom astmatičnim pacijentima uz klasičnu terapiju pokazalo je vrlo pozitivne rezultate. U usporedbi sa skupinom koja je uz terapiju unosila placebo pripravak, kod pacijenata koji su unosili propolis značajno je smanjen broj i ozbiljnost noćnih astmatičnih napadaja. Također, kod pacijenata je uočeno poboljšanje plućnih funkcija, smanjenje količine proupalnih citokina i povećanje količine zaštitnih citokina. Navedeno istraživanje potvrđuje potencijal propolisa u liječenju alergijski posredovanih bolesti (KHAYYAL i sur., 2003.).

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Ekstrakcija i standardizacija propolisa

Ekstrakcija uzorka propolisa topola tipa provedena je prema patentu WO 2020/169425 RADIĆA i suradnika (2020.). Priprema uzorka za ekstrakciju uključivala je hlađenje sirovog propolisa na -20 °C u trajanju od minimalno jednog sata te usitnjavanje prosijavanjem kroz pore veličine od 1 do 8 mm. Nakon pripreme uzorka uslijedio je postupak ekstrakcije propolisa maceracijom u otapalu koje se sastojalo od polietilen glikola 400 (PEG 400) i sojinog lecitina, u omjeru propolisa i otapala 1:2. Postupak ekstrakcije trajao je 24 sata na sobnoj temperaturi. Nakon ekstrakcije dobiveni ekstrakt je filtriran, a inicijalni ekstrakt je imao 35,3 % propolisa. Kvantitativna analiza uključivala je provođenje postupka tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) kako bi se utvrdile četiri ključne aktivne tvari prema kojima je propolis standardiziran. Navedene aktivne tvari po kemijskom sastavu pripadaju skupini fenolnih kiselina, a one su: *para*-kumarinska kiselina, ferulična kiselina, kavena kiselina i fenil ester kavene kiseline (CAPE). Standardizacija uzorka propolisa provedena je daljnjim razrjeđivanjem dobivenog filtrata u svježem ekstrakcijskom otapalu (istih karakteristika kao i otapalo koje je korišteno pri maceraciji) do željenih koncentracija navedenih aktivnih tvari. Inicijalni ekstrakt korišten u ovom istraživanju tri puta je razrjeđivan u omjeru 1:2, prvi puta PEG-om 400, a zatim dva puta PBS-om, uz centrifugiranje između svakog ciklusa razrjeđenja PBS-om.

#### 3.2. Utvrđivanje i analiza koncentracije aktivnih tvari u propolisu

Metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) je na Zavodu za prehranu i dijetetiku domaćih životinja Veterinarskog fakulteta provedena analiza otopine dobivenog ekstrakta. Postupak je proveden koristeći UV-Vis detektor (Shimadzu, Kyoto, Japan) u cilju utvrđivanja i kvantifikacije polifenola i ostalih aktivnih tvari (markera) u otopini (PELLATI i sur., 2013.). Pri analizi je korištena Ascentis Express C18 (Supelco, SAD), dimenzija 150 x 3 mm i čestica punjenja promjera 2.7 µm. Mobilna faza se sastojala od 0,1 % mravlje kiseline i metanola, s promjenjivim gradijentom metanola: 0-3 minuta do 20 %, 3-10 minuta do 30 %, 10-40 minuta

od 30 % do 40 %, 40-50 minuta od 40 % do 60 %, 50-60 minuta od 60 % do 80 %, 60-65 minuta od 80 % do 50 %, 100 minuta do 30 % i 105 minuta do 20 %. Protok mobilne faze bio je 0,25 ml/min dok je temperatura kolone bila 30 °C, a volumen injekcije 10 µl. Na valnoj duljini od 370 nm se odvijala detekcija, a integracija je bila na 290 nm. Pri navedenim uvjetima ostvaren je tlak od 210 do 290 bara.

### 3.3. Mikrobiološki postupci

Svi navedeni mikrobiološki postupci i metoda procjene antimikrobne aktivnosti propolisa provedeni su u mikrobiološkom laboratoriju Zavoda za molekularnu medicinu, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

#### 3.3.1. Priprema mikroorganizama za nasađivanje i postupak podešavanja optičke gustoće suspenzije

Pri ispitivanju antimikrobne učinkovitosti ekstrakta propolisa korištene su bakterija *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 i ATCC 29213) i gljivica *Candida albicans* (ATCC 10231). Za nasađivanje mikroorganizama korištena je čvrsta hranjiva podloga, Müller Hintonov agar (MHA), koja je nakon zagrijavanja prelijevanjem raspodijeljena u Petrijeve zdjelice (ploče) s poklopcem. Staklenim ili mikrobiološkim štapićem su na ohlađene hranjive podloge nasađeni ispitivani mikroorganizmi. Ploče s mikroorganizmima su inkubirane na 37 °C i to 24 sata za bakterije, a 48 sati za gljivicu. Nakon inkubacije su uzgojene bakterijske kulture sterilnom metalnom ezom prenesene u staklene epruvete u kojima je bila potrebna količina fiziološke otopine s fosfatnim puferom (engl. *phosphate buffer saline*, PBS). Optička gustoća navedene suspenzije stanica je denziometrijski podešena na 0.5 McFarlandovih jedinica. Nakon podešavanja su takve suspenzije korištene za daljnje mikrobiološke postupke.

### 3.3.2. Postupak određivanja antimikrobnog učinka i izračunavanja minimalne inhibicijske koncentracije (MIK)

Postupak određivanja antimikrobnog učinka izveden je na mikrotitarskim pločicama koje su sadržavale 96 jažica. Bakterijske i gljivične suspenzije optičke gustoće 0.5 McFarlanda su razrijeđene Luria-Broth bujonom (LB) u omjeru 1:10. Izvorni ekstrakt propolisa koncentracije 35,3 %, također je razrijeđen PBS-om u omjeru 1:10 kako bi se dobila koncentracija od 3,53 %. Nakon razrijeđivanja slijedilo je njihovo nasađivanje u jažice mikrotitarske pločice. U jažice prvih redova dodano je 100  $\mu$ l razrijeđenih mikroorganizama i 100  $\mu$ l razrijeđenog propolisa koncentracije 3,53 %. Jažicama drugih redova je osim 100  $\mu$ l razrijeđenih mikroorganizama i 100  $\mu$ l razrijeđenog propolisa (3,53 %) dodano i 100  $\mu$ l bujona. U jažice svih ostalih redova je prije provođenja dvostrukog serijskog razrijeđivanja također dodano 100  $\mu$ l bujona. Postupak dvostrukog serijskog razrijeđenja provodio se prebacivanjem 100  $\mu$ l mješavine iz drugog reda u sljedeći red u kojem se nalazio samo bujon. Iz trećeg reda je na isti način prebačeno 100  $\mu$ l u četvrti red, a postupak je proveden do zadnjeg reda uzevši u obzir da je posljednjih 100  $\mu$ l je bačeno. Za svaki ispitivani mikroorganizam je postupak ponovljen tri puta u tri stupca. Izrađene su i četiri kontrole po mikroorganizmu u kojima je bilo 100  $\mu$ l mikroorganizama razrijeđenih u omjeru 1:10 i 100  $\mu$ l bujona, a kontrole su se nalazile na desnom kraju pločice. Pločice pripremljene na ovaj način su inkubirane na 37 °C kroz 24 sata za bakterije, a 48 sati za gljivicu nakon čega je njihov sadržaj nasađivan metalnom ezom na ranije pripremljene ploče s MHA-om. Ploče s agarom, namijenjene za određivanje minimalne inhibicijske koncentracije (MIK), su podijeljene na osam dijelova kako bi se na svaki od njih nasadio sadržaj iz jedne ispitivane jažice. Ploče namijenjene za kontrolne uzorke su bile podijeljene na četiri dijela, po jedan dio za svaku kontrolu. Nakon nasađivanja su i one inkubirane kroz 24 sata, odnosno 48 sati na 37 °C, a nakon inkubacije slijedila je procjena bakterijskog rasta u zdjelicama. Minimalna inhibicijska koncentracija je određena EUCAST metodom određivanjem i izračunavanjem koncentracije propolisa kod koje je zaustavljen bakterijski rast.



### 3.3.3. Određivanje koncentracije proteina i dvolančane DNK bakterije (engl. *double-stranded DNA*, dsDNA) *S. aureus* (ATCC 6538) u izvanstaničnom matriksu

Za određivanje koncentracije proteina i dsDNA u izvanstaničnom matriksu su pripremljena četiri uzorka i to dva ispitivana uzorka te pozitivna i negativna kontrola. Uzorci i kontrole sastojali su se od 900 µl bakterija vrste *S. aureus* optičke gustoće 0.5 McFarlanda razrijeđenih u omjeru 1:10 i 100 µl ispitivanih otopina. Prvi pripremljeni uzorak je sadržavao 900 µl bakterija i 100 µl propolisa koncentracije 3,53 %, a drugi uzorak je uz 900 µl bakterija sadržavao 100 µl propolisa koncentracije 1,765 %. Uz ispitivane uzorke načinjene su pozitivna i negativna kontrola. Pozitivna kontrola se sastojala od 900 µl bakterija i 100 µl 96 %-tnog etanola, a negativna kontrola je uz bakterije sadržavala 100 µl LB medija. Nakon pripreme uzoraka su u zadanim točkama spektrofotometrijskim uređajem BioSpec-nano izmjerene koncentracije proteina i dsDNA koje su iz bakterijske stanice izašle u izvanstanični matriks. Koncentracije su izmjerene 1 sat, 3 sata, 6 sati i 20 sati nakon pripreme uzoraka, a mjerenju je prethodilo centrifugiranje uzoraka. Mjerenje koncentracije se provodilo pipetiranjem 1 µl supernatanta uzoraka kako bi se izbjegla aspiracija taloga, a zatim je 1 µl supernatanta lagano prebačen na predviđeno mjesto uređaja te je pokrenut proces kvantifikacije količine proteina i dsDNA u uzorku. Nakon očitavanja su svi zapisani rezultati programski analizirani i grafički prikazani.

### 3.3.4. Metoda dinamičke procjene antimikrobne aktivnosti propolisa – *Time kill kinetics assay*

U svrhu procjene dinamičkih interakcija propolisa i bakterije *S. aureus* (ATCC 29213), odnosno propolisa i gljivice *C. albicans* (ATCC 10231) u određenom vremenskom razdoblju proveden je *Time kill kinetics assay*. Koncentracija mikroorganizama podešena je na optičku gustoću od 0.5 McFarlanda i razrijeđena LB medijem u omjeru 1:10. U jednu epruvetu je prebačeno 1,5 ml razrijeđene *S. aureus* i 0,5 ml propolisa koncentracije 2xMIK, a u drugu 1,5 ml razrijeđene *C. albicans* te također 0,5 ml propolisa koncentracije 2xMIK. Obje epruvete su prenesene na laboratorijsku tresilicu gdje je njihov sadržaj homogeniziran kroz 1 sat na 37 °C. Isti postupak je paralelno provođen za negativne kontrole koje su se sastojale od 1,5 ml razrijeđenih mikroorganizama i 0,5 ml PBS-a te za uzorke s djelotvornim antimikrobnim

pripravnom koji su se sastojali od 1,5 ml mikroorganizama i 0,5 ml antimikrobnog pripravka koncentracije 10 µg/ml. Za bakteriju *S. aureus* je korišteno 10 µg/ml kloramfenikola, a za *C. albicans* 10 µg/ml nistatina. Eppendorfove epruvete koje su se koristile u prvoj točki mjerenja su pripremljene i označene za vrijeme homogenizacije. U svaku od pripremljenih Eppendorfovih epruveta je prebačeno 900 µl LB medija te je u prvu dodano 100 µl mješavine *S. aureus* i propolisa s tresilice. U drugu epruvetu je dodano 100 µl antimikrobnog pripravka, a treća epruveta je korištena kao negativna kontrola te je u nju prebačeno 100 µl iz epruvete koja ne sadrži ni propolis ni antimikrobni pripravak. Nakon toga je iz svake od tih epruveta na ploče s MHA-om prebačeno te staklenim štapićem razmazano 100 µl. Nakon nasađivanja su ploče označene i inkubirane na 37 °C kroz 24 sata, a stakleni štapić je dezinficiran etanolom i ispran pročišćenom vodom. Isti postupak je proveden i za *C. albicans*. Osnovne epruvete s propolisom, negativnom kontrolom i antimikrobnim pripravkom su nakon svakog uzorkovanja vraćene na tresilicu do sljedećeg uzorkovanja. Opisani se postupak izvodio u nekoliko vremenskih razdoblja od inokulacije mikroorganizama kroz 24 sata, a pri svakom uzorkovanju su korištene nove Eppendorfove epruvete. Nakon isteka inkubacije prebrojene su bakterijske kolonije na pločama te su u računalnom programu nacrtane krivulje.

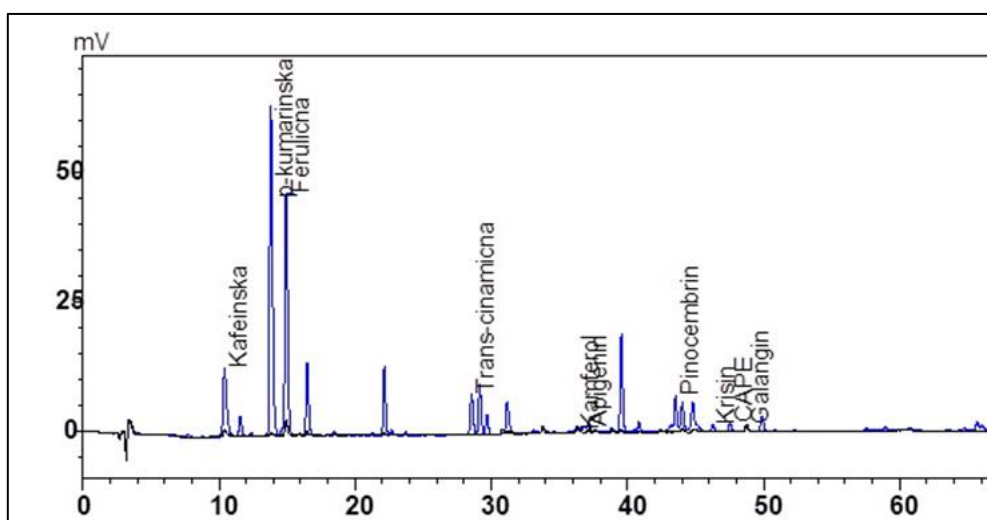
### 3.4. Obrada i grafičko prikazivanje podataka

Rezultati mjerenja su obrađeni korištenjem računalnih programa Microsoft Excel i GraphPad Prism 8. Nakon obrade su u svrhu boljeg predočavanja i razumijevanja, rezultati prikazani tablično i grafički u programu GraphPad Prism 8.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Koncentracije aktivnih tvari u propolisu

Metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) dobivene su koncentracije četiriju markera (*para*-kumarinske kiseline, ferulične kiseline, kavene (kafeinske) kiseline i CAPE-a) prema kojima je uzorak propolisa standardiziran. Na Slici 1. je vidljiv kromatogram na kojem se, uz vrhove ovih četiriju markera, nalaze i vrhovi još nekih utvrđenih aktivnih tvari. Od ostalih aktivnih tvari se na kromatogramu mogu vidjeti vrhovi *trans*-cinamične kiseline, pinocembrina, apigenina, kampferola, krisina i galangina. Među tim ostalim aktivnim tvarima zabilježen je najveći vrh flavonoida pinocembrina.



Slika 1. Kromatogram bezalkoholnog ekstrakta propolisa s vrhovima markera i ostalih aktivnih tvari.

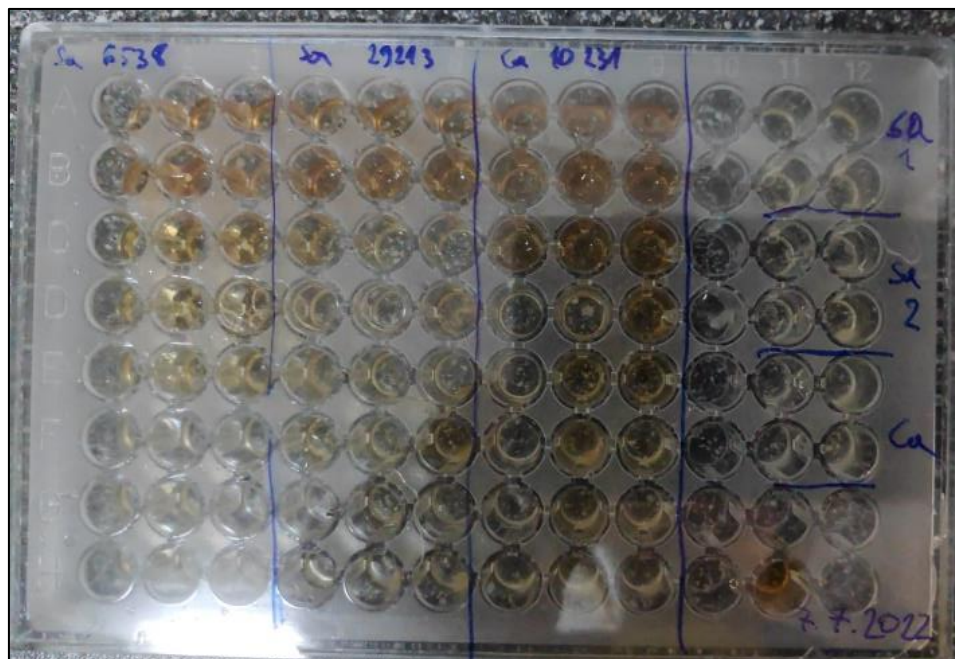
Tablica 1. prikazuje točne koncentracije markera u uzorku nakon što je on razrijeđen jednom u omjeru 1:2 s PEG-om 400, a zatim dva puta PBS-om u omjeru 1:2. Vidljivo je da je uzorak propolisa sadržavao najviše ferulične kiseline, a najmanje CAPE-a.

Tablica 1. Koncentracije markera prema kojima je propolis standardiziran izražene u  $\mu\text{g/g}$ .

Marker	Koncentracija ( $\mu\text{g/g}$ )
Kavena kiselina	218,08
<i>Para</i> -kumarinska kiselina	524,74
Ferulična kiselina	544,06
CAPE	31,55

#### 4.2. Minimalna inhibicijska koncentracija (MIK) bezalkoholnog ekstrakta propolisa

Koncentracija antimikrobnog pripravka koja je zaustavila vidljivi rast mikroorganizama nakon inkubacije naziva se minimalna inhibicijska koncentracija (MIK). Određivane su minimalne inhibicijske koncentracije bezalkoholnog ekstrakta propolisa za bakteriju *S. aureus* (ATCC 6538 i ATCC 29213) i gljivicu *C. albicans* (ATCC 10231). Na Slici 2. nalazi se mikrotitarska pločica s ispitivanim mikroorganizma u triplikatu, a na desnoj strani se nalaze kontrole.



Slika 2. Mikrotitarska pločica korištena za određivanje MIK-a.

Procjenom inhibicije bakterijskog rasta određen je MIK koji je u Tablici 2. izražen u postocima propolisa u ekstraktu. Iz rezultata je vidljivo da je propolis bio učinkovitiji protiv gljivice *C. albicans* (ATCC 10231) i bakterije *S. aureus* (ATCC 29213), nego protiv bakterije *S. aureus* (ATCC 6538). S obzirom na to da je propolis u trećem razrjeđenju djelomično inhibirao rast bakterije *S. aureus* (ATCC 6538) za MIK je određena koncentracija između dva razrjeđenja, odnosno koncentracija od 1,324 % propolisa. Na Slikama 3., 4. i 5. nalaze se ploče s ispitivanim mikroorganizmima nakon inkubacije.

Tablica 2. Minimalna inhibicijska koncentracija ekstrakta propolisa za ispitivane mikroorganizme.

Mikroorganizmi	MIK (% propolisa)
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	0,883
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	0,883
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	1,324



Slika 3. Ploče na kojima je određen MIK za gljivicu *C. albicans* (ATCC 10231).



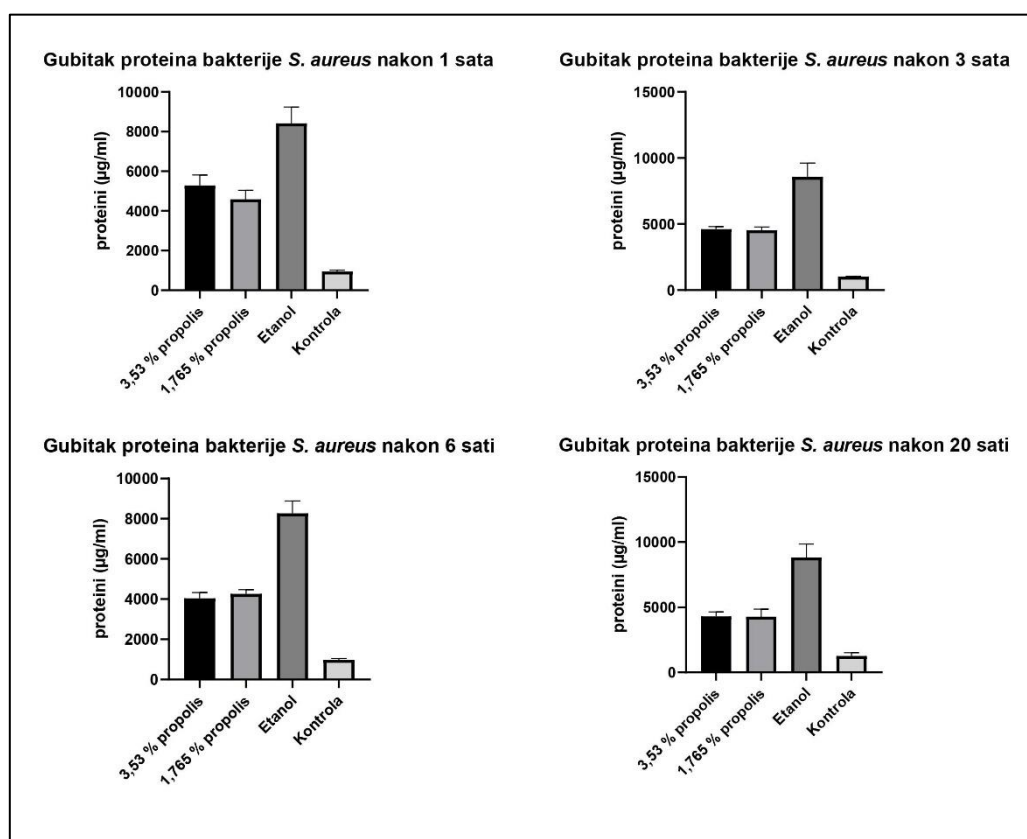
Slika 4. Ploče na kojima je određen MIK za bakteriju *S. aureus* (ATCC 29213).



Slika 5. Ploče na kojima je određen MIK za bakteriju *S. aureus* (ATCC 6538).

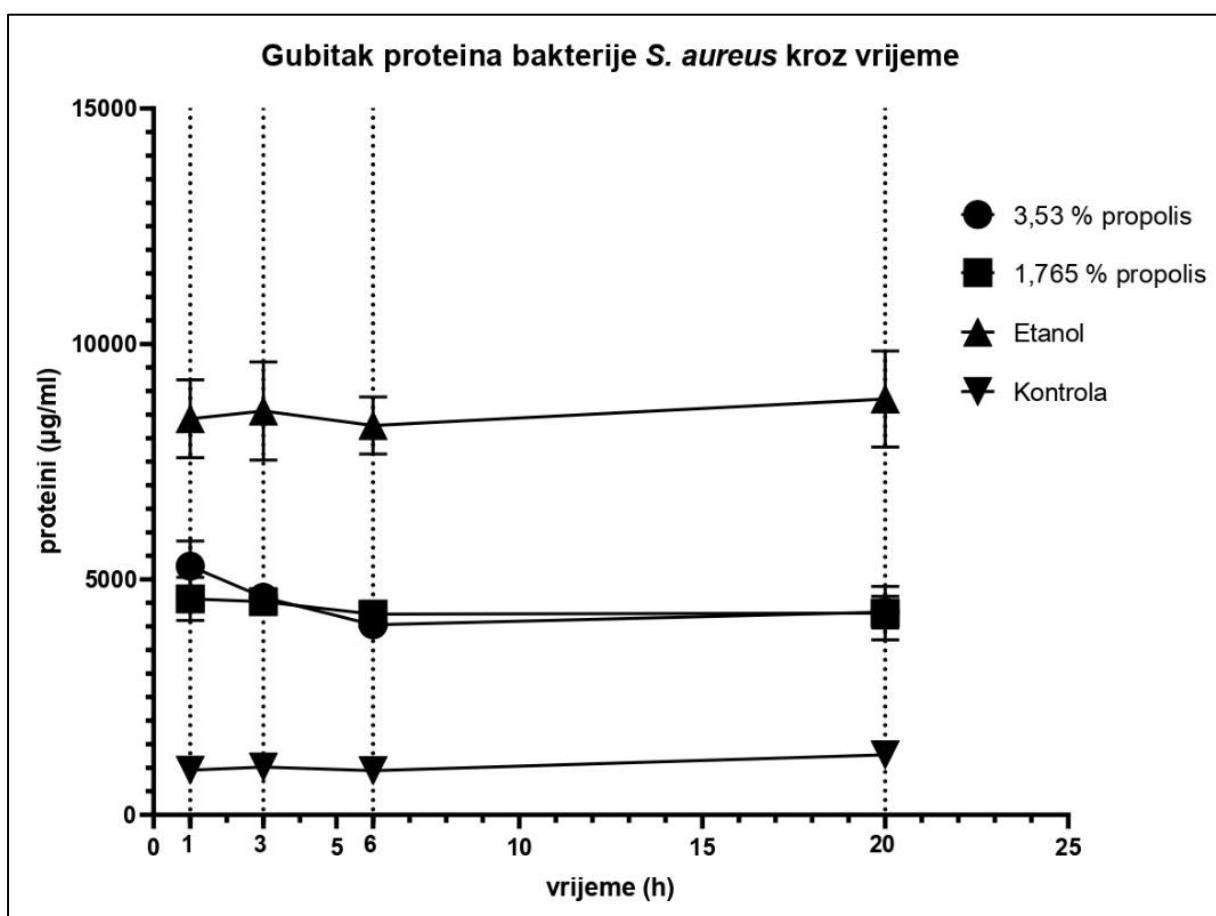
### 4.3. Koncentracije proteina i dsDNA u izvanstaničnom matriksu

Na Slikama 6. i 7. prikazane su izmjerene koncentracije proteina u izvanstaničnom matriksu nakon izlaganja bakterije *S. aureus* (ATCC 6538) propolisu koncentracije 3,53 % i 1,765 %. Navedene koncentracije propolisa odgovaraju vrijednostima 2,67xMIK i 1,33xMIK za ispitivanu bakteriju. Nakon prvog sata su izmjerene veće koncentracije proteina kod uzorka s 3,53 % propolisa, nego kod uzorka s 1,765 % propolisa, no u ostalim mjerenjima se koncentracija u izvanstaničnom matriksu nije značajno razlikovala. Koncentracije proteina u uzorcima koji su sadržavali propolis bile su više od 4 puta veće u odnosu na koncentracije izmjerene u uzorku koji je sadržavao bakterijsku kontrolu. Najveće izmjerene koncentracije proteina bile su izmjerene u uzorku koji je sadržavao etanol, i to 8,1 put veće od uzorka s bakterijskom kontrolom i oko 1,9 puta veće od ispitivanih uzoraka s propolisom.



Slika 6. Koncentracije proteina u izvanstaničnom matriksu nakon izlaganja bakterije *S. aureus* djelovanju bezalkoholnog ekstrakta propolisa u vremenskim razdobljima 1, 3, 6 i 20 sati nakon izlaganja. Koncentracija proteina je iskazana u µg/ml. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja ± SD.

Na Slici 7. nalazi se usporedba koncentracija proteina u izvanstaničnom matriksu tijekom vremena. Vidljivo je da nije bilo značajnijeg porasta ili pada koncentracije, iako su najveće koncentracije izmjerene nakon prvoga sata izlaganja. Srednje vrijednosti koncentracije proteina u uzorcima iznosile su: 4561,53  $\mu\text{g/ml}$  za uzorak koji je sadržavao 3,53 % propolisa (2,67xMIK), 4415,29  $\mu\text{g/ml}$  za uzorak koji je sadržavao 1,765 % propolisa (1,33xMIK), 8522,55  $\mu\text{g/ml}$  za uzorak s 96%-tnim etanolom i 1054,85  $\mu\text{g/ml}$  za kontrolni bakterijski uzorak.

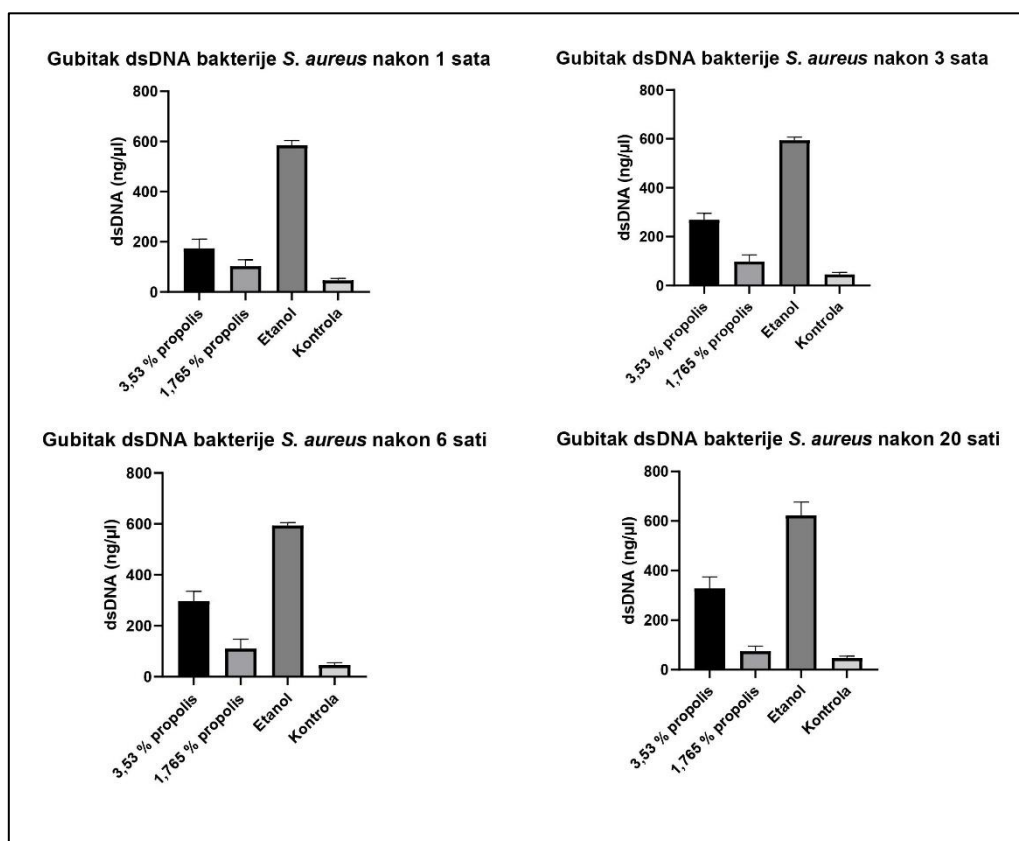


Slika 7. Vremenski prikaz izmjerenih koncentracija proteina u izvanstaničnom matriksu nakon izlaganja bakterije *S. aureus* djelovanju pripravka. Koncentracija proteina je izmjerena 1, 3, 6 i 20 sati nakon izlaganja, a iskazana je u  $\mu\text{g/ml}$ . Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti mjerenja  $\pm$  SD.

Na Slikama 8. i 9. prikazane su izmjerene koncentracije dvolančane DNK (dsDNA) u izvanstaničnom matriksu nakon izlaganja bakterije *S. aureus* (ATCC 6538) uzorcima propolisa koncentracije 3,53 % i 1,765 %. Koncentracije izmjerene dsDNA u uzorcima s propolisom se

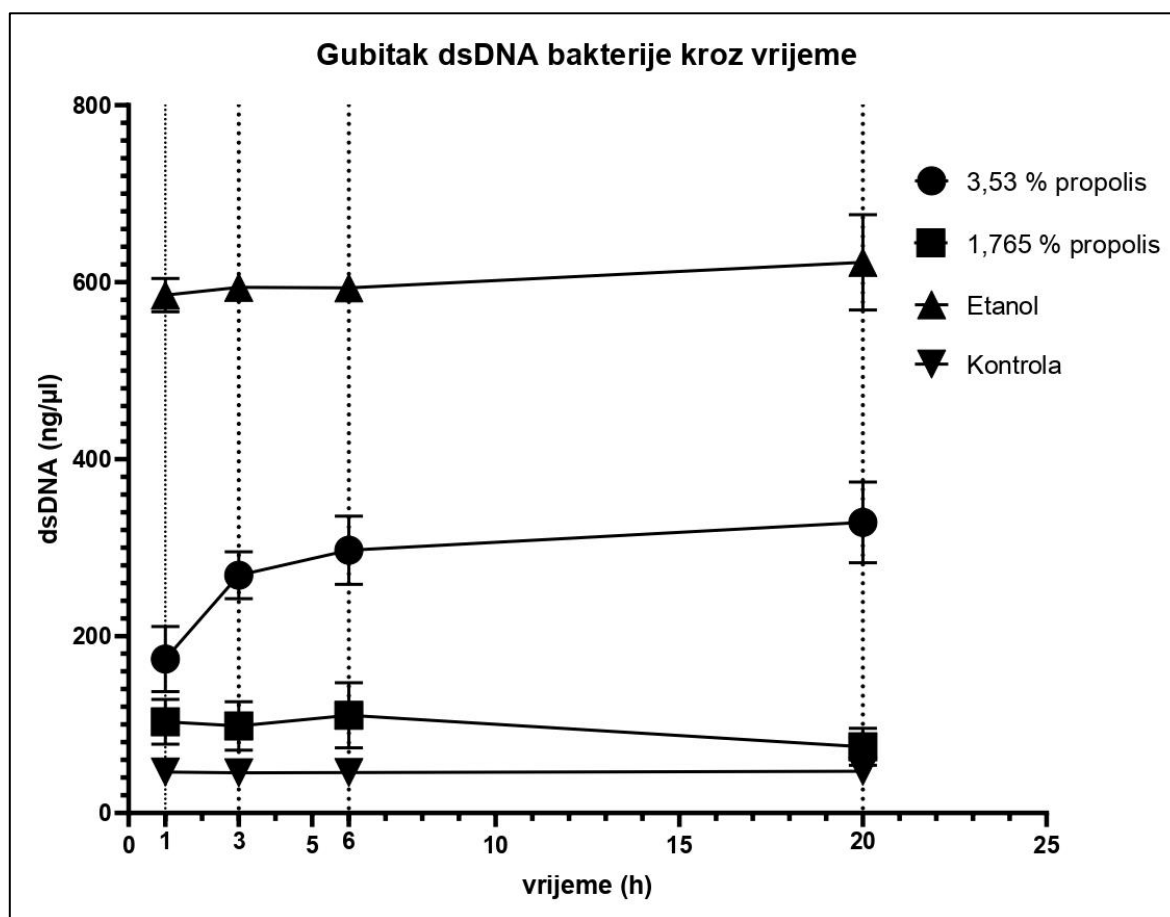


više međusobno razlikuju u odnosu na izmjerene koncentracije proteina. Nakon 20 sati su izmjerene koncentracije dsDNA u uzorku koji je sadržavao 3,53 % propolisa bile 6,97 puta veće u odnosu na izmjerene koncentracije dsDNK uzorka s bakterijskom kontrolom. Srednje vrijednosti koncentracija dsDNA izmjerenih u uzorku s etanolom bile su 2,24 puta veće od koncentracije dsDNA u uzorku koji je sadržavao 3,53 % propolisa, 6,19 puta veće od koncentracije u uzorku s 1,765 % propolisa i 13,2 puta veće od koncentracije u uzorku s bakterijskom kontrolom. Najveće razlike u izmjerenoj koncentraciji uzorka s 1,765 % propolisa i bakterijske kontrole opažene su nakon 6. sata kad je izmjerena 2,4 puta veća koncentracija dsDNA u uzorku s propolisom.



Slika 8. Koncentracije dvolančane DNK (dsDNA) u izvanstaničnom matriksu nakon izlaganja bakterije *S. aureus* djelovanju pripravka u vremenskim razdobljima 1, 3, 6 i 20 sati nakon izlaganja. Koncentracije DNK su iskazane u ng/μl. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost mjerenja ± SD.

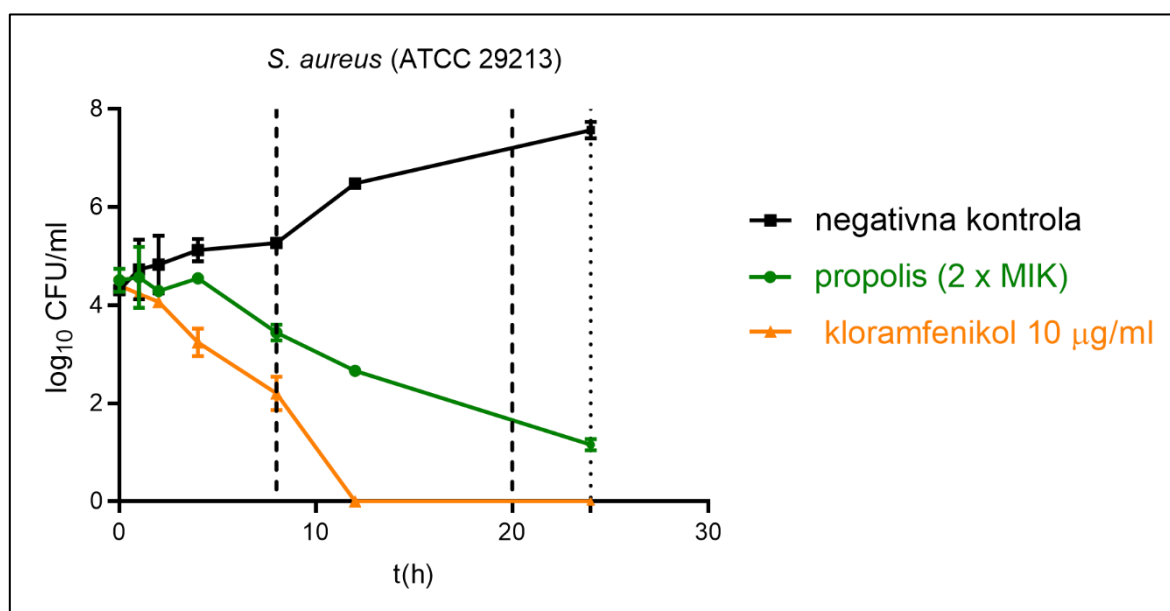
Na Slici 9. nalazi se vremenski prikaz svih izmjerenih koncentracija dsDNA. Iz slike je vidljivo da je došlo do porasta izmjerenih vrijednosti dsDNA u uzorcima koji su sadržavali propolis koncentracije 3,53 %. Koncentracija dsDNA je porasla za 35,3 % nakon 3. sata u odnosu na koncentraciju nakon 1. sata, a za 41,44 % nakon 6. sata u odnosu na vrijednosti nakon 1. sata. Razlike u mjerenjima mogu se uočiti jedino kod uzorka s 3,53 % propolisa, dok su izmjerene koncentracije dsDNA u ostalim uzorcima bile relativno stalne. Srednje vrijednosti svih mjerenja koncentracija dsDNA iznosile su 267,06 ng/ $\mu$ l za uzorak s 3,53 % propolisa, 96,71 ng/ $\mu$ l za uzorak s 1,765 %, 598,86 ng/ $\mu$ l za 96 %-tni etanol i 46,17 ng/ $\mu$ l za bakterijsku kontrolu.



Slika 9. Vremenski prikaz izmjerenih koncentracija izvanstanične dvolančane DNK (dsDNA) nakon izlaganja bakterije *S. aureus* djelovanju pripravka. Koncentracije DNK izmjerene su 1, 3, 6 i 20 sati nakon izlaganja, a iskazane su u ng/ $\mu$ l. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti mjerenja  $\pm$  SD.

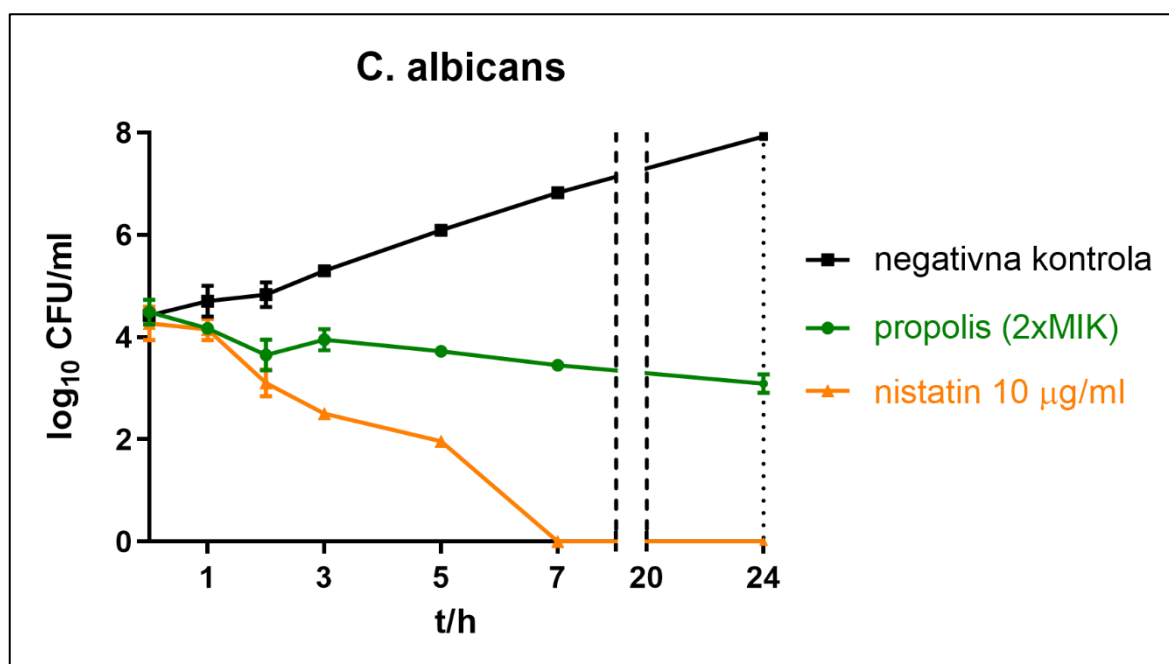
#### 4.4. Time-kill krivulja

Na Slici 10. nalazi se *time-kill* krivulja koja prikazuje dinamičku interakciju između propolisa koncentracije 2xMIK i bakterije *S. aureus* u određenom vremenskom razdoblju u usporedbi s negativnom kontrolom i kloramfenikolom. Smatra se da uzorak ima baktericidan učinak, odnosno da je ubijeno 99,9 % bakterija, ako je došlo do smanjenja broja kolonija većeg od 3 log<sub>10</sub> u odnosu na broj kolonija u početnoj točki mjerenja. U slučaju da se broj kolonija vremenom ne mijenja riječ je o bakteriostatskom učinku uzorka, a u slučaju da je došlo do bakterijskog rasta u odnosu na početnu točku mjerenja smatra se da uzorak nema antimikrobni učinak ili da ima blagi antimikrobni učinak (ovisno o stupnju rasta). Na Slici 10. može se primijetiti da se broj kolonija bakterije *S. aureus* zbog primjene propolisa smanjuje prolaskom vremena od inokulacije. Vidljivo je i da je nakon 12 sati došlo do značajnog smanjenja broja kolonija, a nakon 24 sata je ostvaren baktericidan učinak.



Slika 10. Prikaz dinamičke interakcije propolisa koncentracije 2xMIK i bakterije *S. aureus*. Broj bakterijskih kolonija je izražen u log<sub>10</sub> CFU/ml, a vrijeme (t) od inokulacije je izraženo u satima (h).

Na Slici 11. nalazi se *time-kill* krivulja koja prikazuje dinamičku interakciju između propolisa koncentracije 2xMIK i gljivice *C. albicans* u određenom vremenskom razdoblju u usporedbi s negativnom kontrolom i nistatinom. Broj kolonija gljivice *C. albicans* se nakon primjene propolisa polako smanjuje. Nakon 6 sati je došlo do značajnog smanjenja broja kolonija, a nakon 12 sati više nije bilo rasta gljivičnih kolonija. S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da propolis koncentracije 2xMIK na gljivicu *C. albicans* djeluje mikostatski.



Slika 11. Prikaz dinamičke interakcije propolisa koncentracije 2xMIK i gljivice *C. albicans*. Broj gljivičnih kolonija je izražen u log<sub>10</sub> CFU/ml, a vrijeme (t) od inokulacije je izraženo u satima (h).

## 5. RASPRAVA

Provođenjem istraživanja sastava, učinkovitosti i potencijalnog mehanizma djelovanja standardiziranog ekstrakta propolisa prema bakteriji *S. aureus* i gljivici *C. albicans* zaključili smo da ekstrakt inhibira rast *S. aureus* i *C. albicans* te da djeluje na bakterijsku stijenkku povećavajući njezinu permeabilnost. Ispitivani ekstrakt propolisa je u svom sastavu sadržavao četiri markera biološke aktivnosti – kavenu kiselinu, *para*-kumarinsku kiselinu, feruličnu kiselinu i CAPE – prema kojima je standardiziran. Smatra se da su navedeni markeri, uz polifenole, odgovorni za većinu učinaka propolisa te da je njihov sinergijski odnos unutar ekstrakta pridonio boljoj antimikrobnoj učinkovitosti (CUSHNIE i LAMB, 2005.; BONVEHI i sur., 1994.). Osim navedenih markera, metodom HPLC-a utvrđeno je još šest aktivnih spojeva koji određuju ispitivani ekstrakt. Određivanjem koncentracije proteina i dsDNA u izvanstaničnom matriksu *S. aureus* nakon primjene različitih koncentracija ekstrakta ustanovili smo da je došlo do istjecanja unutarstaničnog materijala zbog nastalih promjena na bakterijskoj stijenci. Iako koncentracija propolisa nije bitno utjecala na izmjerene koncentracije proteina u izvanstaničnom matriksu, opaženo je da je više dsDNA bakterija istjecalo kod propolisa veće koncentracije. Osim toga, utvrdili smo da propolis djeluje baktericidno na bakteriju *S. aureus*, a mikostatski na gljivicu *C. albicans*. Osobitost navedenih zaključaka leži u činjenici da je pri istraživanju korišten standardizirani ekstrakt propolisa koji za razliku od ekstrakata korištenih u drugim istraživanjima ne sadrži alkohol.

Propolis koji možemo pronaći na području Europe se najčešće svrstava u europski, topola tip propolisa. Sirovina za njegov nastanak je smola s pupoljaka različitih vrsta topole (*Populus* spp.), a njegovom sastavu uz topolu doprinose i različite vrste hrasta, brijesta i jasena te obična breza, bijela vrba i divlji kesten (BANKOVA i sur., 2000.; SALATINO i sur., 2005.; RISTIVOJEVIĆ i sur., 2015.; MÄRGHITAŞ i sur., 2013.). Zbog prisutnosti različitih klimatskih uvjeta na ovom području je uz europski tip propolisa moguće pronaći i uzorke mediteranskih odrednica. Područje uz Jadransko more i Gorska Hrvatska obiluju crnogoričnim vrstama biljaka kao što su biljke iz porodice čempresa, borova i smreke koje su dominantan izvor smola mediteranskog propolisa (POPOVA i sur., 2009.; POPOVA i sur., 2010.; POPOVA i sur., 2011.; MELLIOU i CHINOÛ, 2004.). Učinkovitost europskog tipa propolisa se najčešće pripisuje visokom udjelu flavonoida i fenola u istraživanim uzorcima. U našem je istraživanju iz bezalkoholnog propolisa izolirano više derivata cinamične kiseline, ester cinamične kiseline te pet flavonoida. Dobiveni profili propolisa se podudaraju s profilima

drugih autora koji su analizirali europski propolis. Među prvima koji su analizirali sastav etanolnih ekstrakata propolisa na području Republike Hrvatske bili su BARBARIĆ i suradnici (2010.). Oni su iz 17 uzoraka propolisa izolirali tri fenolne kiseline i osam flavonoida. Fenolne kiseline ferulična, p-kumarinska i kavena te flavonoidi galangin, pinocembrin, kampferol i krisin izolirani su i u našem istraživanju. TLAK GAJGER i suradnici (2017.) su iz etanolnih ekstrakata s različitih područja Republike Hrvatske izolirali flavonoide galangin, krisin, tektokrisin, pinocembrin, apigenin i kampferol te fenolne kiseline feruličnu i p-kumarinsku kiselinu. Uz izolaciju aktivnih tvari su ispitivali i antimikrobni učinak, a uočena je pozitivna korelacija između udjela polifenola i flavonoida u uzorcima i boljeg antimikrobnog učinka. MAŠEK i suradnici (2018.) su analizirali alkoholne ekstrakte dobivene trima različitim metodama. Uz fenolne kiseline i flavonoide su izolirali i CAPE te zaključili da i malene modifikacije procesa ekstrakcije mogu značajno utjecati na udio pojedinih spojeva u ekstraktima. Također, nisu uočili jasnu korelaciju između kemijskog sastava propolisa i biološke aktivnosti, a slično su potvrdili i KUJUMGIEV i suradnici (1999.). U njihovom istraživanju su ekstrakti propolisa s različitih geografskih nalazišta djelotvorni, bez obzira na njihov sastav i udio aktivnih tvari. Također, aktivnost pojedinih spojeva u propolisu u dosadašnjim istraživanjima nikada nije nadmašila aktivnost cjelovitog ekstrakta (BONVEHI i sur., 1994.; KUJUMGIEV i sur., 1999.). Sastavnice propolisa djeluju jedna na drugu, a s obzirom na bolji učinak cjelovitog ekstrakta može se zaključiti da je njihovo međudjelovanje sinergijsko (ORŠOLIĆ i sur., 2004.). Kod europskog propolisa su i maleni udjeli flavonoida (iznad 1 %) dovoljni za antimikrobnu učinkovitost (KOSTALEC i sur., 2005.).

Antimikrobna učinkovitost propolisa se najčešće istražuje na predstavnicima gram-pozitivnih bakterija, gram-negativnih bakterija i gljivica. Analizom rezultata antibakterijske učinkovitosti propolisa prema više od 600 sojeva, PRZYBYŁEK i KARPIŃSKI (2019.) su uočili bolje djelovanje raznih tipova propolisa na gram-pozitivne bakterije, nego na gram-negativne bakterije. MIRZOEVA i suradnici (1997.) smatraju da je za ovaj fenomen odgovorna razlika u građi vanjske membrane nekih gram-negativnih bakterija. Sustav porina i lipopolisaharida se razlikuje ovisno o vrsti bakterije, a i neke od gram-negativnih vrsta posjeduju hidrolitičke enzime koji mogu uništiti manje stabilne, ali visoko djelotvorne sastavnice propolisa. Zbog navedene činjenice i ubikvitarnosti smo u istraživanju antibakterijskog učinka koristili dva soja bakterije *S. aureus*. Bakterija *S. aureus* je široko rasprostranjena u bolničkim sustavima diljem svijeta te često uzrokuje kožne infekcije koje se mogu liječiti topikalnom primjenom antimikrobnih pripravaka. Jedan od glavnih problema

vezanih uz bakteriju *S. aureus* je njezin brz razvoj rezistencije na antibiotike (AL-TAWFIQ i TAMBYAH, 2014.; LEE i sur., 2018.). Osim navedene bakterije, čest uzrok oboljenja sluznica je i nametnička gljivica *C. albicans* koju smo također koristili pri istraživanju antimikotičkog djelovanja propolisa (BERRETTA i sur., 2013.). Određivanjem MIK-a smo potvrdili da standardizirani ekstrakt propolisa djeluje na oba ispitivana mikroorganizma. Ovisno o soju, MIK za bakteriju *S. aureus* je bio u rasponu od 0,883 % do 1,324 % propolisa, dok je MIK za jedini ispitivani soj gljivice *C. albicans* iznosio 0,833 % propolisa. Dobivene vrijednosti MIK-a su slične vrijednostima koje su dobili ŠURAN i suradnici (2021b.) za bezalkoholne ekstrakte. I drugi autori su također određivali MIK ekstrakata europskog propolisa, no pri tom su koristili etanolne ekstrakte. U njihovim rezultatima su vidljive određene razlike u antimikrobnoj učinkovitosti prema istim sojevima mikroorganizama različitih ekstrakata s užeg područja (TLAK GAJGER i sur., 2017.), a razlike su uočljive i kod korištenja različitih metoda ekstrakcije (MAŠEK i sur., 2018.). Osobitosti izabrane metode ekstrakcije i otapala utječu na prisutnost i koncentracije spojeva u završnom ekstraktu i u slučajevima kada se pri ekstrakciji koriste jednaki uzorci sirovog propolisa (WOŹNIAK i sur., 2020.).

Mnogi autori su dokazali antimikrobnu učinkovitost propolisa, no puno je manje autora koji se bave istraživanjem mehanizma kojima propolis djeluje na mikroorganizme. Važna odrednica pri ovakvim istraživanjima je i vrsta ekstrakata koja se koristi zbog mogućeg djelovanja čistog otapala na bakterijsku stanicu. Prema SFORCINU i BANKOVI (2011.) propolis na bakterijske stanice može djelovati izravnim i neizravnim učincima. U literaturi se kao glavni mehanizmi djelovanja navode učinci propolisa na građu membrane i stijenke bakterije, proizvodnju ATP-a, bakterijsku mobilnost, inhibiciju enzima i sinteze nukleinskih kiselina te na supresiju stvaranja biofilma. Nadalje, propolis smanjuje bakterijsku rezistenciju i potiče imunosni odgovor tijela (PRZYBYŁEK i KARPIŃSKI, 2019.; ALMUHAYAWI, 2020.). Od svih navedenih mehanizma, u našem smo istraživanju ispitivali utjecaj propolisa na bakterijsku stijenkku i membranu. Već smo nakon jednog sata izlaganja *S. aureus* propolisu uočili istjecanje proteina i dsDNA iz unutarstaničnog medija bakterije u izvanstanični matriks. Najveće koncentracije proteina u izvanstaničnom matriksu izmjerene su jedan sat nakon izlaganja bakterije uzorcima propolisa različitih koncentracija, dok su se izmjerene koncentracije dsDNA u uzorcima mijenjale prolaskom vremena. Povećanje koncentracije propolisa nije značajno utjecalo na koncentracije proteina koje su iz bakterijske stanice izašle u izvanstanični matriks, dok je na istjecanje dsDNA imalo veći utjecaj. Moguće je da duža izloženost bakterija većim koncentracijama propolisa uzrokuje nastanak više mikrooštećenja

kroz koja su zbog veličine u izvanstanični matriks mogle proći samo nukleinske kiseline. Najveće količine nukleinskih kiselina u izvanstaničnom matriksu bakterija *S. aureus* i *E. coli* uočili su i TORRES i suradnici (2018.) ispitujući etanolne ekstrakte propolisa pčela rodova *Melipona* i *Tetragonisca*. Nadalje, zanimljivo je da su najveće koncentracije proteina i dsDNA u izvanstaničnom matriksu izmjerene kod kontrolnog uzorka s 96 %-tnim etanolom što pokazuje koliki utjecaj na bakterijsku membranu može imati izbor samog otapala jer je ranije dokazano da etanol samostalno uzrokuje oštećenja membranskih lipida (SUN i SUN, 1985.; GOLDSTEIN, 1986.). Naši rezultati potvrđuju rezultate istraživanja MIRZOEVE i suradnika (1997.) koji su ispitali mehanizam antibakterijskog djelovanja propolisa na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije. Autori su pretpostavili da glavni mehanizam sastavnica propolisa uključuje mijenjanje permeabilnosti bakterijske membrane. Također, autori navode da se promjene membranskog potencijala i elektrokemijskog gradijenta protona zbivaju dužinom cijele stanice što važno utječe na održavanje sinteze ATP-a, membranski transport i motilitet. Promjene izgleda i funkcije bakterijske membrane i stijenke bakterija *S. agalactiae*, *S. aureus* i MRSA-e nakon primjene etanolnog ekstrakta uočene su i elektronskim mikroskopom (TAKAISI-KIKUNI i SCHILCHER, 1994.; ZHANG i sur., 2022.).

Kako bismo razumjeli djelovanje propolisa na bakterijsku stijenku i membranu moramo promotriti njihovu građu i funkciju. Stijenka gram-pozitivnih bakterija ima debeli peptidoglikanski sloj i stanične proteine koji reguliraju prolaz molekula koje se nalaze izvan stanice u stanicu. Iako je peptidoglikanski sloj selektivno propustan za veće molekule, malene molekule poput polifenola se mogu slobodno kretati kroz stijenku (HUBER i sur., 2003.; STRAHL i ERRINGTON, 2017.; TYPAS i SOURJIK, 2015.; SETLOW i SETLOW, 1993.). Sastavnice propolisa, kao što su flavonoidi, ulaze u bakterijske stanice i prolaskom kroz lipidne membrane te je uočeno da su u tome uspješniji oni spojevi koji imaju manje hidroksilnih skupina. Lipofilnost aktivnih tvari se smanjuje povećanjem broja hidroksilnih skupina i veličine spoja što omogućava lakši prolaz kroz lipidne barijere manje polarnim spojevima (AMOROS i sur., 1992.). Neki od flavonoida reagiraju s hidrofилnom regijom fosfolipida stanične membrane pa i na taj način uzrokuju poremećaje u sustavu bakterijskih membrana (HE i sur., 2014.). Opisane interakcije s bakterijskom stijenkom i membranom uzrokuju njihova oštećenja te posljedičnu inhibiciju diobe i bakteriolizu (ZHANG i sur., 2022.). MIRZOEVA i suradnici (1997.) smatraju da se porastom koncentracije propolisa ubrzava i povećava baktericidan učinak te da zbog toga propolis djeluje baktericidno, a ne bakteriostatski. Naši rezultati potvrđuju pretpostavke drugih autora da je jedan od mehanizama



djelovanja propolisa njegov učinak na bakterijsku membranu i stijenku. Ipak, važno je napomenuti se navedeni učinak na permeabilnost bakterijske membrane i stijenke u našem istraživanju može pripisati isključivo propolisu, s obzirom na to da nije korišten etanolni ekstrakt kao u drugim istraživanjima.

Jedan dio našeg istraživanja odnosio se na procjena antimikrobne učinkovitosti propolisa prema bakteriji *S. aureus* i gljivici *C. albicans* u zadanim vremenskim razdobljima. Prema našim rezultatima propolis koncentracije 2xMIK djelovao je baktericidno na *S. aureus*, a mikostatski na gljivicu *C. albicans*. Dinamičku interakciju propolisa i mikroorganizama koristeći istu metodu proučavali su i drugi autori. DRAGO i suradnici (2000.) su određivali antibakterijski i antimikotički učinak europskog propolisa na više vrsta mikroorganizama među kojima su i *S. aureus* i *C. albicans*. Autori su koristili više koncentracija propolisa te su prema rezultatima zaključili da propolis više djeluje bakteriostatski, nego baktericidno. U njihovom je istraživanju zaustavljanje bakterijskog rasta *S. aureus* i smanjivanje broja kolonija bilo sporije kod primjene propolisa koncentracije 2xMIK nego u našem istraživanju. Osim toga je kod primijene propolisa koncentracije 2xMIK na gljivicu *C. albicans* nakon 6 sati uočen gljivični rast što u našem istraživanju nije bio slučaj. Ove razlike u rezultatima moguće je objasniti primjenom različitih ekstrakata propolisa, što podupire činjenicu važnosti odabira dobre metode ekstrakcije. AL-ANI i suradnici (2018.) su također određivali utjecaj samostalnog propolisa i propolisa u kombinaciji s antibioticima vankomicinom, oksacilinom i levofloksacinom na rast nekoliko bakterija među kojima je i MRSA. U njihovom istraživanju je propolis samostalno imao određeni bakteriostatski učinak, no u kombinaciji s antibioticima je djelovao baktericidno. Navedeno istraživanje potvrđuje sinergističko međudjelovanje propolisa i antibiotika.

Pri provođenju istraživanja identificirali smo nekoliko ograničenja. Prvo ograničenje s kojim smo se susreli je vezano uz broj vrsta i sojeva mikroorganizama u istraživanju. Naše istraživanje antimikrobnog učinka propolisa provedeno je na dvama sojevima bakterije *S. aureus* i na jednom soju gljivice *C. albicans*. Ovi su mikroorganizmi odabrani zbog njihove učestalosti i široke rasprostranjenosti u okolišu uz čest razvoj rezistencije *S. aureus* na antibiotike (AL-TAWFIQ i TAMBYAH, 2014.; LEE i sur., 2018.). Oba mikroorganizma često uzrokuju infekcije sluznica i kože na kojima se najčešće primjenjuju pripravci od propolisa. Istraživani ekstrakt je idealan za topikalnu primjenu jer ne sadrži alkohol pa nije agresivan, ne dehidrira i ne iritira sluznice i kožu zbog čega je prije razvoja proizvoda potrebno ispitati njegovu djelotvornost na odabrana dva mikroorganizma. Sljedeće ograničenje se odnosi na

nedostatak kontrole koja bi sadržavala samo ekstrakt propolisa u istraživanju koncentracije proteina u izvanstaničnom matriksu. Ranije analize količine proteina u ekstraktima potvrdile su da se na 100 grama propolisa može izolirati samo 1 gram proteina (BOGDANOV, 2014.). Drugi autori su opisali da se raspon količine proteina u propolisu kreće između 0,8 i 1,18 %, što također ne bi značajno utjecalo na dobivene rezultate (AHMED i sur., 2017.; ABDULLAH i sur., 2020.). Bez obzira na to, u budućnosti bi bilo dobro analizirati točnu količinu proteina u ispitivanom uzorku propolisa. Nadalje, u našem istraživanju su osim koncentracija proteina izmjerene i koncentracije dsDNA koja se nalazi isključivo u bakterijama pa uzorak čistog ekstrakta ne bi imao utjecaja na ove rezultate. U budućim istraživanjima trebalo bi voditi računa o navedenim ograničenjima i ispitati uzorak različitih koncentracija istraživnog propolisa na više vrsta i sojeva mikroorganizama. Osim toga, patentiranom metodom bi trebalo ekstrahirati više tipova propolisa među kojima bi bio i propolis uzorkovan na različitim klimatskim područjima. Navedene mehanizme potrebno je još bolje istražiti korištenjem većeg broja suvremenijih metoda kao što je upotreba elektronskog mikroskopa, a neizravno djelovanje propolisa moglo bi se ispitati na stanicama te *in vivo*.

Živimo u izazovnom razdoblju u kojem bi rastuća rezistencija mikroorganizama na antimikrobne pripravke mogla postati veliki javnozdravstveni problem. Razvoj novih antimikrobnih pripravaka je vrlo spor i zahtjevan proces, a čak i djelotvorni antibiotici imaju brojne neželjene nuspojave pa se znanstvenici okreću istraživanju prirodnih mješavina (DURAND i sur., 2018.; GHOSH i sur., 2020.; BERRETTA i sur., 2013.). Među prirodnim mješavinama propolis zauzima posebno mjesto jer je riječ o jedinstvenom, prirodnom pčelinjem proizvodu velikih antimikrobnih potencijala (GRANGE i DAVEY, 1990.; BOYANOVA i sur., 2006.; SFORCIN, 2016.). Brojna istraživanja svojstava propolisa pokazala su kako ga se vrlo učinkovito može koristiti samostalno ili u kombinaciji s nekim od poznatih skupina antibiotika kada potencira njihovo djelovanje (AL-WAILI i sur., 2012.; OKSUZ i sur., 2005.; ORSI i sur., 2006.; AL-ANI i sur., 2018.). U primjeni propolisa osjetljivije skupine pacijenata mogu pronaći učinkovitu alternativu za antibiotike jer sam propolis vrlo rijetko izaziva preosjetljivost (ORSI i sur., 2005.). Nadalje, osim antimikrobnog učinka propolis ima široki raspon drugih korisnih prednosti zbog svojeg imunomodulacijskog, antitumorskog i antioksidacijskog učinka (HU i sur., 2005.; ORŠOLIĆ i sur., 2004.; SOCHA i sur., 2015.). Ipak, na svojstva propolisa uvelike utječe odabir metode ekstrakcije i svojstva otapala (WOŽNIAK i sur., 2020.). Formulacija ekstrakta propolisa koju smo ispitali u istraživanju dobivena je korištenjem bezalkoholnog, netoksičnog i jeftinog otapala. Otapalo

koje je korišteno je ekološki prihvatljivo, ne ostavlja rezidue te je prikladno i za primjenu kod trudnica, dojilja, pedijatrijskih i veterinarskih pacijenata (KUBILIENE i sur., 2018.; ŠURAN i sur., 2021a.). Za razliku od alkohola, primijenjeno otapalo (PEG 400) se često koristi u kozmetici i proizvodnji lijekova jer nije agresivno i ne iritira sluznice, a pomoću njega je moguće razviti različite vrste antimikrobnih pripravaka kao što su organogelovi i intramamarni pripravci (SANTANA i sur., 2012.; KULKARNI i sur., 2013.; BALATA i sur., 2014.; ŠURAN i sur., 2020.). U ovom istraživanju je, prema našem znanju, po prvi puta određen mehanizam antibakterijskog djelovanja ovog bezalkoholnog, standardiziranog ekstrakta propolisa pa analizirane rezultate možemo pripisati samostalnom djelovanju propolisa. Navedene spoznaje su samo mali, ali vrijedan doprinos razumijevanju propolisa i njegovoj primjeni u svrhu borbe protiv patogenih mikroorganizama i njihove rezistencije.

## 6. ZAKLJUČCI

Provođenjem istraživanja učinkovitosti i mehanizma djelovanja patentiranog i bezalkoholnog ekstrakta propolisa topola tipa te analizom prikupljenih rezultata možemo zaključiti da:

- ispitivani uzorak propolisa sadrži markere biološke aktivnosti i polifenole.
- je propolis učinkovito djelovao protiv bakterije *S. aureus* i gljivice *C. albicans* inhibirajući njihov rast.
- propolis djeluje baktericidno na bakteriju *S. aureus*, a mikostatski na gljivicu *C. albicans*.
- je jedan od mehanizama antibakterijskog djelovanja propolisa vezan uz njegovo povećanje permeabilnosti bakterijske membrane i stijenke u dovoljnoj mjeri da iz bakterijske stanice u izvanstanični matriks mogu izaći proteini i nukleinske kiseline.
- koncentracija propolisa ne utječe značajno na povećanje količine proteina izvan bakterijske stanice tijekom vremena, ali da ima veći utjecaj na količine nukleinskih kiselina koje su napustile stanicu.
- je učinkovito djelovanje ekstrakta propolisa dokazano i uz primjenu inovativnog otapala koje za razliku od alkohola nije imalo utjecaj na bakterijsku membranu i stijenku. Navedenim smo dokazali i potvrdili puni potencijal čistog propolisa bez utjecaja otapala na rezultate.
- dobiveni rezultati mogu biti korisna osnova za provođenje daljnjih istraživanja i moguću komercijalnu primjenu.

## 7. LITERATURA

1. ABDULLAH, N. A., N. ZULLKIFLEE, S. N. Z. ZAINI, H. TAHA, F. HASHIM, A. USMAN (2020): Phytochemicals, mineral contents, antioxidants, and antimicrobial activities of propolis produced by Brunei stingless bees *Geniotrigona thoracica*, *Heterotrigona itama*, and *Tetrigona binghami*. Saudi J. Biol. Sci. 27, 2902-2911.
2. ABU-MELLAL, A., N. KOOLAJI, R. K. DUKE, V. H. TRAN, C. C. DUKE (2012): Prenylated cinnamate and stilbenes from Kangaroo Island propolis and their antioxidant activity. Phytochemistry 77, 251-259.
3. AFROUZAN, H., S. ZAKERI, A. A. MEHRIZI, S. MOLASALEHI, A. TAHGHIGHI, M. A. SHOKRGOZAR, A. ES-HAGHI, N. D. DJADID (2017): Antiplasmodial assessment of four different Iranian propolis extracts. Arch. Iran. Med. 20, 270-281.
4. AGÜERO, M. B., M. GONZALEZ, B. LIMA, L. SVETAZ, M. SÁNCHEZ, S. ZACCHINO, G. E. FERESIN, G. SCHMEDA- HIRSCHMANN, J. PALERMO, D. WUNDERLIN, A. TAPIA (2010): Argentinean Propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae), Exudates: Phytochemical Characterization and Antifungal Activity. J. Agric. Food Chem. 58, 194-201.
5. AHMED, E. T., O. M. ABO-SALEM, A. OSMAN (2011): The influence of Egyptian propolis on induced burn wound healing in diabetic rats; antibacterial mechanism. Sci. J. Med. Clin. Trials 2011, Article ID: 2011-2317.
6. AHMED, R., E. M. TANVIR, M. S. HOSSEN, R. AFROZ, I. AHMMED, N. E. N. RUMPA, S. PAUL, S. H. GAN, S. A. SULAIMAN, M. I. M. KHALIL (2017): Antioxidant Properties and Cardioprotective Mechanism of Malaysian Propolis in Rats. Evid. Based Complement. Altern. Med. 11, 5370545.
7. AHN, M. R., K. KUNIMASA, T. OHTA, S. KUMAZAWA, M. KAMIHIRA, K. KAJI, Y. UTO, H. HORI, H. NAGASAWA, T. NAKAYAMA (2007): Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artepillin C inhibits *in vitro* tube formation and endothelial cell proliferation. Cancer Lett. 252, 235-243.
8. AL-ANI, I., S. ZIMMERMANN, J. REICHLING, M. WINK (2018): Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. Medicines 5, 2.

9. ALM, J., T. E. OHNMEISS, J. LANZA, L. VRIESENKA (1990): Preference of cabbage white butterflies and honey bees for nectar that contains amino acids. *Oecologia* 84, 53-57.
10. ALMUHAYAWI, M. S. (2020): Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi J. Biol. Sci.* 27, 3079-3086.
11. AL-TAWFIQ, J. A., P. A. TAMBYAH (2014): Healthcare associated infections (HAI) perspectives. *J. Infect. Public Health* 7, 339-344.
12. AL-WAILI, N., A. AL-GHAMDI, M. ANSARI, Y. ALATTAL, K. SALOM (2012): Synergistic Effects of Honey and Propolis toward Drug Multi-Resistant *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli* and *Candida Albicans* Isolates in Single and Polymicrobial Cultures. *Int. J. Med. Sci.* 9, 793-800.
13. AMOROS, M., C. M. O. SIMÕES, L. GIRRE, F. SAUVAGER, M. CORMIER (1992): Synergistic Effect of Flavones and Flavonols Against Herpes Simplex Virus Type 1 in Cell Culture. Comparison with the Antiviral Activity of Propolis. *J. Nat. Prod.* 55, 1732-1740.
14. ANONIMUS (2022): ICH guideline Q3C (R8) on impurities: guideline for residual solvents. EMA/CHMP/ICH/82260/2006.
15. ANSORGE, S., D. REINHOLD, U. LENDECKEL (2003): Propolis and Some of its Constituents Down-Regulate DNA Synthesis and Inflammatory Cytokine Production but Induce TGF- $\beta$ 1 Production of Human Immune Cells. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* 58, 580-589.
16. AZWANIDA, N. N. (2015): A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med. Aromat. Plants* 4, 1-6.
17. BALATA, G., H. M. EL NAHAS, S. RADWAN (2014): Propolis organogel as a novel topical delivery system for treating wounds. *Drug Deliv.* 21, 55-61.
18. BALOUIRI, M., M. SADIKI, S. K. IBNSOUDA (2016): Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 6, 71-79.
19. BANKOVA, V. (2005): Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacol.* 100, 114-117.

20. BANKOVA, V. S., R. S. CHRISTOV, A. D. TEJERA (1998a): Lignans and other constituents of propolis from the canary islands. *Phytochemistry* 49, 1411-1415.
21. BANKOVA, V. S., S. L. DE CASTRO, M. C. MARCUCCI (2000): Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31, 3-15.
22. BANKOVA, V., A. S. GALABOV, D. ANTONOVA, N. VILHELMOVA, B. DI PERRI (2014a): Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus. *Phytomedicine* 21, 1432-1438.
23. BANKOVA, V., B. TRUSHEVA, M. POPOVA (2021): Propolis extraction methods: a review, *J. Apic. Res.* 60, 734-743.
24. BANKOVA, V., D. BERTELLI, R. BORBA, B. J. CONTI, I. B. D. S. CUNHA, C. DANERT, M. N. EBERLIN, S. I. FALCÃO, M. I. ISLA, M. I. N, MORENO, G. PAPOTTI, M. POPOVA, K. B. SANTIAGO, A. SALAS, A. C. H. F. SAWAYA, N. V. SCHWAB, J. M. SFORCIN, M. SIMONE-FINSTROM, M. SPIVAK, B. TRUSHEVA, M. VILAS-BOAS, M. WILSON, C. ZAMPINI (2016): Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *J. Apic. Res.* 58, 1-49.
25. BANKOVA, V., G. BOUDOUROVA-KRASTEVA, S. POPOV, J. M. SFORCIN, S. R. C. FUNARI (1998b): Seasonal Variations in Essential Oil from Brazilian Propolis. *J. Essent. Oil Res.* 10, 693-696.
26. BANKOVA, V., M. POPOVA, B. TRUSHEVA (2014b): Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chem. Cent. J.* 8, 1-8.
27. BANKOVA, V., N. NIKOLOVA, M. MARCUCCI (1996): A New Lignan from Brazilian Propolis. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* 51, 735-737.
28. BANKOVA, V., R. CHRISTOV, A. KUJUMGIEV, M. C. MARCUCCI, S. POPOV (1995): Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* 50, 167-172.
29. BANKOVA, V., R. CHRISTOV, S. POPOV, M. MARCUCCI, I. TSVETKOVA, A. KUJUMGIEV (1999): Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia* 70, 190-193.
30. BARBARIĆ, M., K. MIŠKOVIĆ, M. BOJIĆ, M. B. LONČAR, A. SMOLČIĆ-BUBALO, Z. DEBELJAK, M. MEDIĆ-ŠARIĆ (2011): Chemical composition of the

- ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. J. Ethnopharmacol. 135, 772-778.
31. BARTH, O. M., C. F. LUZ (2003): Palynological analysis of Brazilian geopropolis sediments. Grana 42, 121-127.
  32. BASSANI-SILVA, S., J. SFORCIN, A. AMARAL, L. GASPAR, N. ROCHA (2007): Propolis effect *in vitro* on canine Transmissible Venereal Tumor cells. Rev. Port. de Ciênc. Vet. 102, 261-265.
  33. BATISTA, M. C. A., B. V. B. ABREU, R. P. DUTRA, M. S. CUNHA, F. M. M. AMARAL, L. M. B. TORRES, M. N. S. RIBEIRO (2016): Chemical composition and antioxidant activity of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* (Meliponinae) in flooded fields and cerrado areas of Maranhão State, northeastern Brazil. Acta. Amaz. 46, 315-322.
  34. BAZO, A. P., M. A. M. RODRIGUES, J. M. SFORCIN, J. L. V. DE CAMARGO, L. R. RIBEIRO, D. M. F. SALVADORI (2002): Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. Teratog. Carcinog. Mutagen. 22, 183-194.
  35. BERNAYS, E. A., G. C. DRIVER, M. BILGENER (1989): Herbivores and plant tannins. Adv. Ecol. Res. 19, 263-302.
  36. BERRETTA, A. A., P. A. DE CASTRO, A. H. CAVALHEIRO, V. S. FORTES, V. P. BOM, A. P. NASCIMENTO, F. MARQUELE-OLIVEIRA, V. PEDRAZZI, L. N. Z. RAMALHO, G. H. GOLDMAN (2013): Evaluation of mucoadhesive gels with propolis (EPP-AF) in preclinical treatment of candidiasis vulvovaginal infection. Evid. Based Complement. Altern. Med. 2013, 641480.
  37. BISCAIA, D., S. R. S. FERREIRA (2009): Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. J. Supercrit. Fluids 51, 17-23.
  38. BOBIŞ, O. (2022): Plants: Sources of Diversity in Propolis Properties. Plants 11, 2298.
  39. BOGDANOV, S. (2014): Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review. Bee Prod. Sci. 1, 1-40.
  40. BOHLMANN, J., C. I. KEELING (2008): Terpenoid biomaterials. Plant J. 54, 656-669.



41. BONVEHI, J. S., F. C. VENTURA, R. E. JORDA (1994): The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis on dietetics. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 529-532.
42. BOYANOVA, L., R. KOLAROV, G. GERGOVA, I. MITOV (2006): *In vitro* activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria. *Anaerobe* 12, 173-177.
43. BURDOCK, G. (1998): Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* 36, 347-363.
44. CAI, C., W. YU, C. WANG, L. LIU, F. LI, Z. TAN (2019): Green extraction of cannabidiol from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) using deep eutectic solvents coupled with further enrichment and recovery by macroporous resin. *J. Mol. Liq.* 287, 110957.
45. ÇELEMLI, Ö. G. (2013): Chemical properties of propolis collected by stingless bees. U: Pot-Honey. (P. Vit, S. R. M. Pedro, D. Roubik, Ur.), Springer, New York, str. 525-537.
46. CHEN, Y. W., S. W. WU, K. K. HO, S. B. LIN, C. Y. HUANG, C. N. CHEN (2008): Characterization of Taiwanese propolis collected from different locations and seasons. *J. Sci. Food Agric.* 88, 412-419.
47. CHENG, P. C., G. WONG (1996): Honey bee propolis: prospects in medicine. *Bee World* 77, 8-15.
48. CHIMSHIROVA, R., M. POPOVA, A. CHAKIR, V. VALCHEVA, S. DIMITROV, B. TRUSHEVA, A. ROMANE, V. BANKOVA (2022): Antimicrobial Triterpenoids and Ingol Diterpenes from Propolis of Semi-Arid Region of Morocco. *Molecules* 27, 2206.
49. CHIRUMBOLO, S. (2011): Propolis as anti-inflammatory and anti-allergic compounds: Which role for flavonoids? *Int. Immunopharmacol.* 11, 1386-1387.
50. CHRISTOV, R., V. BANKOVA, I. TSVETKOVA, A. KUJUMGIEV, A. D. TEJERA (1999): Antibacterial furofuran lignans from Canary Islands propolis. *Fitoterapia* 70, 89-92.

51. CISILOTTO, J., L. P. SANDJO, L. G. FAQUETI, H. FERNANDES, D. JOPPI, M. W. BIAVATTI, T. B. CRECZYNSKI-PASA (2018): Cytotoxicity mechanisms in melanoma cells and UPLC-QTOF/MS 2 chemical characterization of two Brazilian stingless bee propolis: Uncommon presence of piperidinic alkaloids. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 149, 502-511.
52. COELHO, G. R., R. Z. MENDONÇA S. VILAR KDE, C. A. FIGUEIREDO, J. C. BADARI, N. TANIWAKI, G. NAMİYAMA, M. I. DE OLIVEIRA, S. P. CURTI, P. E. SILVA, G. NEGRI (2015): Antiviral Action of Hydromethanolic Extract of Geopropolis from *Scaptotrigona postica* against Antih herpes Simplex Virus (HSV-1). *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015, 296086.
53. COELHO, G.R., C. A. FIGUEIREDO, G. NEGRI, C. C. FERNANDES-SILVA, K. D. S. VILLAR, J. C. BADARI, M. I. DE OLIVEIRA, T.F. BARBOSA, N. N. TANIWAKI, G. M. NAMİYAMA, R.Z. MENDONÇA (2018): Antiviral activity of geopropolis extract from *Scaptotrigona aff. postica* against Rubella virus. *J. Food Res.* 7, 91-106.
54. CONTI, B., K. SANTIAGO, E. CARDOSO, P. FREIRE, R. CARVALHO, M. GOLIM, J. SFORCIN (2016): Propolis modulates miRNAs involved in TLR-4 pathway, NF-κB activation, cytokine production and in the bactericidal activity of human dendritic cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 68, 1604-1612.
55. COTTICA, S. M., A. C. SAWAYA M. N. EBERLIN S. L. FRANCO, L. M. ZEOULA, J. V. VISENTAINER (2011): Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 929-935.
56. COWAN, M. M. (1999): Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 564-582.
57. CRANE, E. (1990): *Beekeeping: Science, Practice and World Recourses*. Heinemann Newnes, Oxford.
58. CUESTA-RUBIO, O., B. A. FRONTANA-URIBE, T. RAMÍREZ-APAN, J. CÁRDENAS (2002): Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosone. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* 57, 372-378.

59. CUI, Q., R. DU, M. LIU, L. RONG (2020): Lignans and Their Derivatives from Plants as Antivirals. *Molecules* 25, 183.
60. CUNHA, I. B. S., A. C. H. F. SAWAYA, F. M. CAETANO, M. T. SHIMIZU, M. C. MARCUCCI, F. T. DREZZA, G. S. POVIA, G. S., P. O. CARVALHO (2004): Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J. Braz. Chem. Soc.* 15, 964-970.
61. CUSHNIE, T. P. T., B. CUSHNIE, A. J. LAMB (2014): Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *Int. J. Antimicrob. Agents* 44, 377-386.
62. CUSHNIE, T. P., A. J. LAMB (2005): Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26, 343-356.
63. CVEK, J., M. MEDIĆ-ŠARIĆ, D. VITALI, I. VEDRINA-DRAGOJEVIĆ, Z. ŠMIT, S. TOMIĆ (2008): The content of essential and toxic elements in Croatian propolis samples and their tinctures. *J. Apic. Res.* 47, 35-45.
64. DA CUNHA, M. G., M. FRANCHIN, L. C. D. C. GALVÃO, A. L. DE RUIZ, J. E. DE CARVALHO, M. IKEGAKI, S. M. DE ALENCAR, H. KOO, P. L. ROSALEN (2013): Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complement. Altern. Med.* 13, 23.
65. DA SILVA, J. F. M., M. C. SOUZA, S. R. MATTA, M. R. ANDRADE, F. V. N. VIDAL (2006): Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem.* 99, 431-435.
66. DAGLIA, M. (2012): Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 174-181.
67. DANTAS, A. P., B. P. OLIVIERI, F. H. M. GOMES, S. L. DE CASTRO (2006): Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. *J. Ethnopharmacol.* 103, 187-193.
68. DAUGSCH, A., C. S. MORAES, P. FORT, Y. K. PARK (2008): Brazilian Red Propolis—Chemical Composition and Botanical Origin. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 5, 435-441.

69. DE CASTRO, M. D. L., F. PRIEGO-CAPOTE (2010): Soxhlet extraction: Past and present panacea. *J. Chromatogr. A* 1217, 2383-2389.
70. DE CASTRO, P. A., V. L. P. BOM, N. A. BROWN, R. S. C. DE ALMEIDA, L. N. Z. RAMALHO, M. SAVOLDI, M. H. S. GOLDMAN, A. A. BERRETTA, G. H. GOLDMAN (2013): Identification of the cell targets important for propolis-induced cell death in *Candida albicans*. *Fungal Genet. Biol.* 60, 74-86.
71. DE LIMA, R. O. A., A. P. BAZO, R. A. SAID, J. M. SFORCIN, V. BANKOVA, B. R. DARROS, D. M. F. SALVADORI (2005): Modifying effect of propolis on dimethylhydrazine-induced DNA damage but not colonic aberrant crypt foci in rats. *Environ. Mol. Mutagen.* 45, 8-16.
72. DEBIAGGI, M., F. TATEO, L. PAGANI, M. LUINI, E. ROMERO (1990): Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. *Microbiologica* 13, 207-213.
73. DELAZAR, A., L. NAHAR, S. HAMEDEYAZDAN, S. D. SARKER (2012): Microwave-Assisted Extraction in Natural Products Isolation. U: Natural Products Isolation. (S. D. Sarker, L. Nahar, Ur.), Springer Science + Business Media, Cham, str. 89-115.
74. DEMIR, S., A. T. ATAYOGLU, F. GALEOTTI, E. U. GARZARELLA, V. ZACCARIA, N. VOLPI, A. KARAGOZ, F. SAHIN (2020): Antiviral activity of different extracts of standardized propolis preparations against HSV. *Antivir. Ther.* 25, 353-363.
75. DIMOV, V., N. LVANOVSKA, N. MANOLOVA, V. BANKOVA, N. NIKOLOV, S. POPOV (1991): Immunomodulatory action of propolis: influence on antiinfectious protection and macrophage function. *Apidologie* 22, 155-161.
76. DING, Q., A. R. SHEIKH, X. GU, J. LI, K. XIA, N. SUN, R. A. WU, L. LUO, Y. ZHANG, H. MA (2020): Chinese Propolis: Ultrasound-assisted enhanced ethanolic extraction, volatile components analysis, antioxidant and antibacterial activity comparison. *Food Sci. Nutr.* 9, 313-330.
77. DOGAN, M., S. SILICI, R. SARAYMEN, I. O. İLHAN (2006): Element content of propolis from different regions of Turkey. *Acta Aliment.* 5, 127-130.

78. DOS SANTOS, C. M., J. F. CAMPOS, H. F. DOS SANTOS, J. B. P. BALESTIERI, D. B. SILVA, K. D. P. SOUZA, C. A. CAROLLO, L. M. ESTEVINHO, E. L. DOS SANTOS (2017): Chemical Composition and Pharmacological Effects of Geopropolis Produced by *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017, 8320804.
79. DRAGO, L., B. MOMBELLI, E. DE VECCHI, M. C. FASSINA, L. TOCALLI, M. R. GISMONDO (2000): In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. *J. Chemother.* 12, 390-395.
80. DUDOIT, A., C. MERTZ, M. CHILLET, N. CARDINAULT, P. BRAT (2020): Antifungal activity of Brazilian red propolis extract and isolation of bioactive fractions by thin-layer chromatography-bioautography. *Food Chem.* 327, 127060.
81. DURAND, G. A., D. RAOULT, G. DUBOURG (2018): Antibiotic discovery: History, methods and perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents* 53, 371-382.
82. EL HADY, F. K. A., A. G. HEGAZI (2002): Egyptian Propolis: 2. Chemical Composition, Antiviral And Antimicrobial Activities Of East Nile Delta Propolis. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* 57, 386-394.
83. EL-GUENDOUIZ, S., B. LYOUSSI, M. G. MIGUEL (2019): Insight on Propolis from Mediterranean Countries: Chemical Composition, Biological Activities and Application Fields. *Chem. Biodivers.* 16, e1900094.
84. ERB, M., D. J. KLIEBENSTEIN (2020): Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. *Plant Physiol.* 184, 39-52.
85. ERDOGAN, S., B. ATES, G. DURMAZ, I. YILMAZ, T. SECKIN (2011): Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1592-1597.
86. ERDTMAN, H. (1963): Some aspects of chemotaxonomy. U: *Chemical Plant Taxonomy*. (T. Swain, Ur.), Academic Press, London, New York, str. 679-708.
87. EROGLU, N., S. AKKUS, M. YAMAN, B. ASCI, S. SILICI (2016): Amino Acid and Vitamin Content of Propolis Collected By Native Cucasian Honeybees. *J. Apic. Res.* 60, 101-110.

88. FEDOTOVA, V., D. KONOVALOV (2019): Propolis Research in Russia. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* 53, 500-509.
89. FERNANDES-SILVA, C. C., A. SALATINO, G. NEGRI, E. U. BREYER, M. L. F. SALATINO (2013): Chemical profiling of six samples of Brazilian propolis. *Quim. Nova* 36, 237-240.
90. FERNÁNDEZ, M. Á., M. ESPINO, F. J. V. GOMEZ, M. F. SILVA (2018): Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products. *Food Chem.* 239, 671-678.
91. FISCHER, G., F. R. CONCEIÇÃO, F. P. L. LEITE, L. A. DUMMER, G. D. VARGAS, S. O. HÜBNER, O. A. DELLAGOSTIN, N. PAULINO, A. S. PAULINO, T. VIDOR (2007): Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine* 25, 1250-1256.
92. FRATINI, F., G. CILIA, B. TURCHI, A. FELICOLI (2016): Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 9, 839-843.
93. FREITAS, A. S., A. CUNHA, P. PARPOT, S. M. CARDOSO, R. OLIVEIRA, C. ALMEIDA-AGUIAR (2022): Propolis Efficacy: The Quest for Eco-Friendly Solvents. *Molecules* 27, 7531.
94. FU, Y., Y. ZU, W. LIU, C. HOU, L. CHEN, S. LI, X. SHI, M. TONG (2007): Preparative separation of vitexin and isovitexin from pigeonpea extracts with macroporous resins. *J. Chromatogr. A* 1139, 206-213.
95. FUNARI, C. S., A. T. SUTTON, R. L. CARNEIRO, K. FRAIGE, A. J. CAVALHEIRO, V. D. S. BOLZANI, E. F. HILDER, R. D. ARRUA (2019): Natural deep eutectic solvents and aqueous solutions as an alternative extraction media for propolis. *Food Res. Int.* 125, 108559.
96. GARCÍA-ROLDÁN, A., L. PIRIOU, P. JAUREGI (2023): Natural deep eutectic solvents as a green extraction of polyphenols from spent coffee ground with enhanced bioactivities. *Front. Plant Sci.* 13, 1072592.

97. GATEA, F., A. O. MATEI, E. D. TEODOR, G. L. RADU (2015): Antioxidant properties and polyphenols composition of some Romanian propolis samples. *Rev. Roum. Chim.* 60, 65-74.
98. GECKIL, H., B. ATES, G. DURMAZ, S. ERDOGAN, I. YILMAZ (2005): Antioxidant, Free Radical Scavenging and Metal chelating characteristics of propolis. *Am. J. Biochem. Biotech.* 1, 27-31.
99. GEKKER, G., S. HU, M. SPIVAK, J. R. LOKENSGARD, P. K. PETERSON (2005): Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *J. Ethnopharmacol.* 102, 158-163.
100. GHISALBERTI, E. L. (1979): Propolis: a review. *Bee World* 60, 59-84.
101. GHOSH, D., B. VEERARAGHAVAN, R. ELANGO VAN, P. VIVEKANANDAN (2020): Antibiotic Resistance and Epigenetics: More to It than Meets the Eye. *Antimicrob. Agents Chemother.* 64, e02225-19.
102. GOLDSTEIN, D. B. (1986): Effect of alcohol on cellular membranes. *Ann. Emerg. Med.* 15, 1013-1018.
103. GRANGE, J. M., R. W. DAVEY (1990): Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J. R. Soc. Med.* 83, 159-160.
104. HARBORNE, J. B., C. A. WILLIAMS (2000): Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
105. HE, F., X. RU, T. WEN (2020): NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 4777.
106. HE, M., T. WU, T., S. PAN, X. XU (2014): Antimicrobial mechanism of flavonoids against *Escherichia coli* ATCC 25922 by model membrane study. *App. Surf. Sci.* 305, 515-521.
107. HEGAZI, A. G., F. K. A. EL HADY (2001): Egyptian propolis: 1. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Upper Egypt Propolis. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* 56, 82-88.

108. HEGAZI, A. G., F. K. A. EL HADY (2002): Egyptian Propolis: 3. Antioxidant, Antimicrobial Activities And Chemical Composition Of Propolis From Reclaimed Lands. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* 57, 395-402.
109. HEGAZI, A. G., F. K. A. EL HADY, H. A. SHALABY (2007a): An *in vitro* effect of propolis on adult worms of *Fasciola gigantica*. *Vet. Parasitol.* 144, 279-286.
110. HEGAZI, A. G., F. K. A. EL HADY, H. A. SHALABY (2007b): Inhibitory effect of Egyptian propolis on *Fasciola gigantica* eggs with reference to its effect on *Clostridium oedematiens* and correlation to chemical composition. *Pak. J. Biol. Sci.* 10, 3295-3305.
111. HERMENEAN, A., T. MARIASIU, I. NAVARRO-GONZÁLEZ, J. VEGARA-MESEGUER, E. MIUȚESCU, S. CHAKRABORTY, H. PÉREZ-SÁNCHEZ (2017): Hepatoprotective activity of chrysin is mediated through TNF- $\alpha$  in chemically-induced acute liver damage: An *in vivo* study and molecular modeling. *Exp. Ther. Med.* 13, 1671-1680.
112. HERNÁNDEZ, I. M., O. CUESTA-RUBIO, M. C. FERNÁNDEZ, A. R. PÉREZ, R. M. O. PORTO, A. L. PICCINELLI, L. RASTRELLI (2010): Studies on the Constituents of Yellow Cuban Propolis: GC-MS Determination of Triterpenoids and Flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 58, 4725-4730.
113. HOSTE, H., C. MARTINEZ-ORTIZ-DE-MONTELLANO, F. MANOLARAKI, S. BRUNET, N. OJEDA-ROBERTOS, I. FOURQUAUX, J. F. J. TORRES-ACOSTA, C. A. SANDOVAL-CASTRO (2012): Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Vet. Parasitol.* 186, 18-27.
114. HOTTA, S., S. UCHIYAMA, K. ICHIHARA (2020): Brazilian red propolis extract enhances expression of antioxidant enzyme genes *in vitro* and *in vivo*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 84, 1820-1830.
115. HOULT, J. R. S., M. PAYÁ (1996): Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol.* 27, 713-722.
116. HROBOŇOVÁ, K., J. LEHOTAY, J. ČIŽMÁRIK, J. SÁDECKÁ (2013): Comparison HPLC and fluorescence spectrometry methods for determination of coumarin derivatives in propolis. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 36, 486-503.



117. HU, F., H. R. HEPBURN, Y. LI, M. CHEN, S. E. RADLOFF, S. DAYA (2005): Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J. Ethnopharmacol.* 100, 276-283.
118. HUANG, S., C. P. ZHANG, K. WANG, G. O. LI, F. L. HU (2014): Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules* 19, 19610-19632.
119. HUBER, B., L. EBERL, W. FEUCHT, J. POLSTER (2003): Influence of Polyphenols on Bacterial Biofilm Formation and Quorum-sensing. *Z. Für Nat.* 58, 879-884.
120. HÜLSKAMP, M. (2004): Plant trichomes: a model for cell differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 471-480.
121. IDRUS, N. F. M., L. N. YIAN, Z. IDHAM, N. A. ARIS, N. R. PUTRA, A. H. A. AZIZ, M. A. C. YUNUS (2018): Mini review: Application of supercritical carbon dioxide in extraction of propolis extract. *Malays. J. Fund. Appl. Sci.* 14, 387-396.
122. INGHAM, J. L. (1983): Naturally Occurring Isoflavonoids (1855–1981). U: *Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products.* (W. Herz, H. Grisebach, G. W. Kirby, Ur.), Springer-Verlag, Wien, New York, str. 1-266.
123. ISIDOROV, V. A., S. BAKIER, E. PIROZNIKOW, M. ZAMBRZYCKA, I. SWIECICKA (2016): Selective behaviour of honeybees in acquiring European propolis plant precursors. *J. Chem. Ecol.* 42, 475-485.
124. IVANČAJIĆ, S., I. MILEUSNIĆ, D. CENIĆ-MILOŠEVIĆ (2010): *In vitro* antibacterial activity of propolis extracts on 12 different bacteria in conditions of 3 various pH values. *Arch. Biol. Sci.* 62, 915-934.
125. IVANOVSKA, N. D., V. B. DIMOV, S. PAVLOVA, V. S. BANKOVA, S. S. POPOV (1995a): Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivative. *J. Ethnopharmacol.* 47, 135-143.
126. IVANOVSKA, N., H. NEYCHEV, Z. STEFANOVA, V. BANKOVA, S. POPOV (1995b): Influence of cinnamic acid on lymphocyte proliferation, cytokine release and *Klebsiella* infection in mice. *Apidologie* 26, 73-81.

127. JEONG, K. W., J. Y. LEE, D. I. KANG, J. U. LEE, S. Y. SHIN, Y. KIM (2009): Screening of Flavonoids as Candidate Antibiotics against *Enterococcus faecalis*. *J. Nat. Prod.* 72, 719-724.
128. KASOTE, D., V. BANKOVA, A. M. VILJOEN (2022): Propolis: chemical diversity and challenges in quality control. *Phytochem. Rev.* 21, 1887-1911.
129. KEELING, C. I., J. BOHLMANN (2006): Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytol.* 170, 657-675.
130. KHALED, S., M. N. MAKLED, M. A. NADER (2021): Protective effects of propolis extract against nicotine-evoked pulmonary and hepatic damage. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 29, 5812-5826.
131. KHAN, S. A., R. ASLAM, H. A. MAKROO (2018): High pressure extraction and its application in the extraction of bio-active compounds: A review. *J. Food Process. Eng.* 42, e12896.
132. KHAYYAL, M. T., M. A. EL-GHAZALY, A. S. EL-KHATIB, A. M. HATEM, P. J. F. DE VRIES, S. EL-SHAFEI, M. M. KHATTAB (2003): A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 17, 93-102.
133. KIM, H. H., Y. BAE, S. H. KIM (2013): Galangin attenuates mast cell-mediated allergic inflammation. *Food Chem. Toxicol.* 57, 209-216.
134. KISMET, K., B. KILICOGLU, O. KORU, M. TANYUKSEL, M. T. ORUC, K. SORKUN, B. SALIH, M. A. AKKUS (2006): Evaluation on scolicidal efficacy of propolis. *Eur. Surg. Res.* 38, 476-481.
135. KOBAYASHI, M., M. YAMAMOTO (2005): Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid. Redox. Signal* 7, 385-394.
136. KÖNIG, B. (1985): Plant sources of propolis. *Bee World* 66, 136-139.
137. KOO, H., P. L. ROSALEN, J. A. CURY, Y. K. PARK, W. H. BOWEN (2002a): Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1302-1309.

138. KOO, H., S. K. PEARSON, K. SCOTT-ANNE, J. ABRANCHES, J. A. CURY, P. L. ROSALEN, Y. K. PARK, R. E. MARQUIS, W. H. BOWEN (2002b): Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol. Immunol.* 17, 337-343.
139. KORU, O., F. TOKSOY, C. H. ACIKEL, Y. M. TUNCA, M. BAYSALLAR, A. U. GUCLU, E. AKCA, A. O. TUYLU, K. SORKUN, M. TANYUKSEL, B. SALIH (2007): *In vitro* antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe* 13, 140-145.
140. KOSALEC, I., S. PEPELJNJAK, M. BAKMAZ, S. VLADIMIR-KNEŽEVIĆ (2005): Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharm.* 55, 423-430.
141. KOWACZ, M., G. H. POLLACK (2020): Propolis-induced exclusion of colloids: Possible new mechanism of biological action. *Colloid Interface Sci. Commun.* 38, 100307.
142. KUBILIENE, L., A. JEKABSONE, M. ZILIUS, S. TRUMBECKAITE, D. SIMANAVICIUTE, R. GERBUTAVICIENE, D. MAJIENE (2018): Comparison of aqueous, polyethylene glycol-aqueous and ethanolic propolis extracts: Antioxidant and mitochondria modulating properties. *BMC Complement. Altern. Med.* 18, 165.
143. KUBILIENE, L., V. LAUGALIENE, A. PAVILONIS, A. MARUSKA, D. MAJIENE, K. BARCAUSKAITE, R. KUBILIUS, G. KASPARAVICIENE, A. SAVICKAS (2015): Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. *BMC Complement. Altern. Med.* 15, 156.
144. KUJUMGIEV, A., I. TSVETKOVA, Y. SERKEDJIEVA, V. BANKOVA, R. CHRISTOV, S. POPOV (1999): Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.* 64, 235-240.
145. KULKARNI, A., S. GILDA, N. ALURKAR, R. BHOSALE, R. OSMANI (2013): Development of Novel Formulation Containing Propolis for Mastitis. *Int. J. Drug Deliv. Technol.* 3, 12-22.

146. KUMAR, S., S. SHARMA, S. K. CHATTOPADHYAY (2013): The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: Ethnobotanical and therapeutic importance. *Fitoterapia* 89, 86-125.
147. KUMAZAWA, S., J. NAKAMURA, M. MURASE, M. MIYAGAWA, M. R. AHN, S. FUKUMOTO (2008): Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behavior observation and phytochemical analysis. *Naturwissenschaften* 95, 781-786.
148. KUMAZAWA, S., M. YONEDA, I. SHIBATA, J. KANAEDA, T. HAMASAKA, T. NAKAYAMA (2003): Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem. Pharm. Bull.* 6, 740-742.
149. KWON, M. J., H. M. SHIN, H. PERUMALSAMY, X. WANG, Y. J. AHN (2020): Antiviral effects and possible mechanisms of action of constituents from Brazilian propolis and related compounds. *J. Apic. Res.* 59, 413-425.
150. LASKAR, R. A., I. SK, N. ROY, N. A. BEGUM (2010): Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chem.* 122, 233-237.
151. LEE, A. S., H. DE LENCASTRE, J. GARAU, J. KLUYTMANS, S. MALHOTRA-KUMAR, A. PESCHEL, S. HARBARTH (2018): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Dis. Primers* 4, 18033.
152. LEONHARDT, S. D., S. ZEILHOFER, N. BLÜTHGEN, T. SCHMITT (2010): Stingless bees use terpenes as olfactory cues to find resin sources. *Chem. Senses.* 35, 603-611.
153. LI, A., H. XUAN, A. SUN, R. LIU, J. CUI (2016): Preparative separation of polyphenols from water-soluble fraction of Chinese propolis using macroporous absorptive resin coupled with preparative high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 1012-1013, 42-49.
154. LIU, B., H. FALKENSTEIN-PAUL, W. SCHMIDT, L. BEERHUES (2003): Benzophenone synthase and chalcone synthase from *Hypericum androsaemum* cell cultures: cDNA cloning, functional expression, and site-directed mutagenesis of two polyketide synthases. *Plant J.* 34, 847-855.

155. MAHMOUD, T. Y., S. M. RIZK, A. S. MAGHRABY, A. A. SHAHEEN (2014): Propolis enhances the effectiveness of praziquantel in experimental schistosomiasis: biochemical and histopathological study. *Parasitol. Res.* 113, 4513-4523.
156. MARCUCCI, M.C., F. A. CAMARGO, C. M. LOPES (1996): Identification of amino acids in Brazilian propolis. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* 51, 11-14.
157. MĂRGHITAȘ, L. A., D. S. DEZMIREAN, O. BOBIȘ (2013): Important developments in romanian propolis research. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013, 159392.
158. MARKHAM, K.R., K. A. MITCHELL, A. L. WILKINS, J. A. DALDY, L. YINRONG (1996): HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry* 42, 205-211.
159. MAŠEK, T., N. PERIN, L. RACANÉ, M. CINDRIĆ, H. Č. PALJETAK, M. PERIĆ, M. MATIJAŠIĆ, D. VERBANAC, B. RADIĆ, J. ŠURAN, K. STARČEVIĆ (2018): Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activity of Different Extracts of Poplar Type Propolis. *Croat. Chem. Acta* 91, 81-88.
160. MAYWORM, M. A., C. A. LIMA, A. C. TOMBA, C. C. FERNANDES-SILVA, M. L. SALATINO, A. SALATINO (2014): Does propolis contain tannins? *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014, 613647.
161. MELLIOU, E., E. STRATIS, I. CHINO (2007): Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – Antimicrobial activity. *Food Chem.* 103, 375-380.
162. MELLIOU, E., I. CHINO (2004): Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis. *Planta Med.* 70, 515-519.
163. MICOL, V., C. R. MATEO, S. SHAPIRO, F. J. ARANDA, J. VILLALÁIN (2001): Effects of (+)-totarol, a diterpenoid antibacterial agent, on phospholipid model membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1511, 281-290.
164. MIGUEL, M. G., S. NUNES, C. CRUZ, J. DUARTE, M. D. ANTUNES, A. M. CAVACO, M. D. MENDES, A. S. LIMA, L. G. PEDRO, J. G. BARROSO, A. C. FIGUEIREDO (2013): Propolis volatiles characterisation from acaricide-treated and -untreated beehives maintained at Algarve (Portugal). *Nat. Prod. Res.* 27, 743-749.

165. MIRZOEVA, O. K., R. N. GRISHANIN, P. C. CALDER (1997): Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res.* 152, 239-246.
166. MOISE, A. R., O. BOBIȘ (2020): *Baccharis dracunculifolia* and *Dalbergia ecastophyllum*, Main Plant Sources for Bioactive Properties in Green and Red Brazilian Propolis. *Plants* 9, 1619.
167. MONROY, Y. M., R. A. RODRIGUES, M. V. RODRIGUES, A. S. SANT'ANA, B. S. SILVA, F. A. CABRAL (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.
168. MORI, A., C. NISHINO, N. ENOKI, S. TAWATA (1987): Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* 26, 2231-2234.
169. NAKAMURA, R., R. NAKAMURA, K. WATANABE, K. OKA, S. OHTA, S. MISHIMA, R. TESHIMA (2010): Effects of propolis from different areas on mast cell degranulation and identification of the effective components in propolis. *Int. Immunopharmacol.* 10, 1107-1112.
170. NEELAM, K. A., K. K. SHARMA (2020): Phenylpropanoids and its derivatives: biological activities and its role in food, pharmaceutical and cosmetic industries. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 60, 2655-2675.
171. NEGRI, G., M. C. MARCUCCI, A. SALATINO, M. L. F. SALATINO (1998): Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes from Brazil. *Apidologie* 29, 305-314.
172. NICHITOI, M. M., A. M. JOSCEANU, R. D. ISOPESCU, G. O. ISOPENCU, E. I. GEANA, C. T. CIUCURE, V. LAVRIC (2021): Polyphenolics profile effects upon the antioxidant and antimicrobial activity of propolis extracts. *Sci. Rep.* 11, 20113.
173. NICOLSON, K., G. EVANS, P. W. O'TOOLE (1999): Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. *FEMS Microbiol. Lett.* 179, 233-239.

174. NIJVELDT, R. J., E. VAN NOOD, D. E. C. VAN HOORN, P. G. BOELEN, K. VAN NORREN, P. A. M. VAN LEEUWEN (2001): Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 418-425.
175. NWEZE, N. E., H. O. OKORO, M. AL ROBAIAN, R. M. K. OMAR, T. A. TOR-ANYIIN, D. G. WATSON, J. O. IGOLI (2017): Effects of Nigerian red propolis in rats infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Comp. Clin. Path.* 26, 1129-1133.
176. OKIŃCZYC, P., J. WIDELSKI, J. SZPERLIK, M. ŻUK, T. MROCZEK, K. SKALICKA-WOŹNIAK, Z. SAKIPOVA, G. WIDELSKA, P. M. KUŚ (2021): Impact of Plant Origin on Eurasian Propolis on Phenolic Profile and Classical Antioxidant Activity. *Biomolecules* 11, 68.
177. OKSUZ, H., N. DURAN, C. TAMER, M. CETIN, S. SILICI (2005): Effect of propolis in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* keratitis in rabbits. *Ophthalmic. Res.* 37, 328-334.
178. OROIAN, M., F. DRANCA, F. URSACHI (2019): Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis. *J. Food Sci. Technol.* 57, 70-78.
179. ORSI, R. O., A. FERNANDES, V. BANKOVA, J. M. SFORCIN (2012a): Antibacterial effects of Brazilian and Bulgarian propolis and synergistic effects with antibiotics acting on the bacterial DNA and folic acid. *Nat. Prod. Res.* 26, 344-349.
180. ORSI, R. O., A. FERNANDES, V. BANKOVA, J. M. SFORCIN (2012b): The effects of Brazilian and Bulgarian propolis *in vitro* against *Salmonella Typhi* and their synergism with antibiotics acting on the ribosome. *Nat. Prod. Res.* 26, 430-437.
181. ORSI, R. O., J. M. SFORCIN, S. R. C. FUNARI, A. FERNANDES, V. BANKOVA (2006): Synergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella Typhi*. *Braz. J. Microbiol.* 37, 108-112.
182. ORSI, R. O., J. M. SFORCIN, S. R. C. FUNARI, J. C. GOMES (2005): Effect of propolis extract on guinea pig lung mast cell. *J. Venom. Anim. Toxins* 11, 76-83.
183. ORSI, R.O., S. R. C. FUNARI, A. M. V. C. SOARES, S. A. CALVI, S. L. OLIVEIRA, J. M. SFORCIN, V. BANKOVA (2000): Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J. Venom. Anim. Toxins* 66, 205-219.

184. ORŠOLIĆ, N., A. H. KNEŽEVIĆ, L. ŠVER, S. TERZIĆ, I. BAŠIĆ (2004): Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds J. Ethnopharmacol. 94, 307-315.
185. OTA, C., C. UNTERKIRCHER, V. FANTINATO, M. T. SHIMIZU (2001): Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. Mycoses 44, 375-378.
186. PANCHE, A. N., A. D. DIWAN, S. R. CHANDRA (2016): Flavonoids: an overview. J. Nutr. Sci. 5, e47.
187. PAOLI, P. P., D. DONLEY, D. STABLER, A. SASEENDRANATH, S. W. NICOLSON, S. J. SIMPSON, G. A. WRIGHT (2014): Nutritional balance of essential amino acids and carbohydrates of the adult worker honeybee depends on age. Amino Acids. 46, 1449-1458.
188. PARK, H., S. H. BAE, Y. PARK, H. S. CHOI, H. J. SUH (2014): Lipase-mediated lipid removal from propolis extract and its antiradical and antimicrobial activity. J. Sci. Food Agric. 95, 1697-1705.
189. PARK, Y. K., M. H. KOO, J. A. S. ABREU, M. IKEGAKI, J. A. CURY, P. L. ROSALEN (1998): Antimicrobial Activity of Propolis on Oral Microorganisms. Curr. Microbiol. 36, 24-28.
190. PARK, Y. K., M. IKEGAKI (1998): Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation of the Preparations. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62, 2230-2232.
191. PATRICIO, E. F. L. R. A., L. CRUZ-LÓPEZ, R. MAILE, J. TENTSCHERT, G. R. JONES, E. D. MORGAN (2002): The propolis of stingless bees: terpenes from the tibia of three *Frieseomelitta* species. J. Insect Physiol. 48, 249-254.
192. PAULA, L. A. D. L., M. F. C. SANTOS, M. C. PAGOTTI, R. FALEIROS, H. P. RAMOS, R. C. S. VENEZIANI, J. K. BASTOS, C. R. CAFFREY, S. R. AMBROSIO, L. G. MAGALHÃES (2020): Uncovering Biological Application of Brazilian Green Propolis: A Phenotypic Screening against *Schistosoma mansoni*. Chem. Biodivers. 17, e2000277.
193. PAULINO, N., S. R. L. ABREU, Y. UTO, D. KOYAMA, H. NAGASAWA, H. HORI, V. M. DIRSCH, A. M. VOLLMAR, A. SCREMIN, W. A. BRETZ (2008): Anti-



- inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. *Eur. J. Pharmacol.* 587, 296-301.
194. PAVIANI, L. C., G. FIORITO, P. SACODA, F. A. CABRAL (2013): Different solvents for extraction of Brazilian green propolis: composition and extraction yield of phenolic compounds. *Proceedings of 3rd Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids*, 1-4 April. Cartagena de Indias, Columbia, str. 1-5.
195. PAVLOVIĆ, R., G. BORGONOVO, V. LEONI, L. GIUPPONI, G. CECILIANI, S. SALA, A. BASSOLI, A. GIORGI (2020): Effectiveness of Different Analytical Methods for the Characterization of Propolis: A Case of Study in Northern Italy. *Molecules* 25, 504.
196. PELLATI, F., F. P. PRENCIPE, D. BERTELLI, S. BENVENUTI (2013): An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 81-82, 126-132.
197. PETRI, G., E. LEMBERKOVICS, F. FOLDVARI (1988): Examination of Differences Between Propolis (Bee Glue) Produced from Different Flora Environment. *U: Flavors and Fragrances: A World Perspective.* (B. M. Lawrence, B. D. Mookherjee, B. J. Willis, Ur.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, str. 439-446.
198. PETROVA, A., M. POPOVA, C. KUZMANOVA, I. TSVETKOVA, H. NAYDENSKI, E. MULI, V. BANKOVA (2010): New biologically active compounds from Kenyan propolis. *Fitoterapia* 81, 509-514.
199. PICCINELLI, A. L., M. C. FERNANDEZ, O. CUESTA-RUBIO, I. M. HERNÁNDEZ, F. DE SIMONE, L. RASTRELLI (2005): Isoflavonoids Isolated from Cuban Propolis. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9010-9016.
200. PICCINELLI, A. L., C. LOTTI, L. CAMPONE, O. CUESTA-RUBIO, M. C. FERNANDEZ, L. RASTRELLI (2011): Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography–Photodiode Array Detection/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 59, 6484-6491.

201. PLAPER, A., M. GOLOB, I. HAFNER, M. OBLAK, T. SOLMAJER, R. JERALA (2003): Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 530-536.
202. POPOVA, M. I. CHINOU, I. MAREKOV, V. BANKOVA (2009): Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry* 70, 1262-1271.
203. POPOVA, M. P., K. GRAIKOU, I. CHINOU, V. S. BANKOVA (2010): GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. *J. Agric. Food Chem.* 58, 3167-3176.
204. POPOVA, M. P., V. S. BANKOVA, S. BOGDANOV, I. TSVETKOVA, C. NAYDENSIC, G. L. MARCAZZAN, A. G. SABATINI (2007): Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie* 38, 306-311.
205. POPOVA, M., B. TRUSHEVA, D. ANTONOVA, S. CUTAJAR, D. MIFSUD, C. FARRUGIA, I. TSVETKOVA, H. NAJDEVSKI, V. BANKOVA (2011): The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. *Food Chem.* 126, 1431-1435.
206. POPOVA, M., B. TRUSHEVA, V. BANKOVA (2019): Propolis of stingless bees: a phytochemist's guide through the jungle of tropical biodiversity. *Phytomedicine* 86, 153098.
207. POPRAVKO, S. A. (1978): Chemical composition of propolis, its origin and standardization. U: A remarkable hive product: propolis. (V. Harnaj, Ur.), Apimondia Publishing House, Bucharest, str. 15-18.
208. PRZYBYŁEK, I., T. M. KARPIŃSKI (2019): Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules* 24, 2047.
209. PUJIRAHAYU, N., H. RITONGA, S. LAKSANANNY, Z. USLINAWATY (2015): Antibacterial activity of oil extract of *Trigona* propolis. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 7, 419-422.
210. QIAN, W. L., Z. KHAN, D. G. WATSON, J. FEARNLEY (2008): Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry. *J. Food Compos. Anal.* 21, 78-83.

211. RADIĆ, S., B. RADIĆ, J. ŠURAN (2020): Liquid Propolis Extract, Its Preparation and Use Thereof. WO Patent 2020169425A1, 2. kolovoza, 2020.
212. RAGHUKUMAR, R., L. VALI, D. WATSON, J. FEARNLEY, V. SEIDEL (2010): Antimethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of 'pacific propolis' and isolated prenylflavanones. *Phytother. Res.* 24, 1181-1187.
213. RAMNATH, S., S. VENKATARAMEGOWDA, C. SINGH (2015): Chemical Composition of Bee Propolis from Different Regions in India by GCMS Analysis. *Int. J. Pharm. Phytochem.* 30, 1319-1328.
214. RANA, A., M. SAMTIYA, T. DHEWA, V. MISHRA, R. E. ALUKO (2022): Health benefits of polyphenols: A concise review. *J. Food Biochem.* 46, e14264.
215. RASHWAN, O. A. (2002): New phenylpropanoid glucosides from *Eucalyptus maculata*. *Molecules* 7, 75-80.
216. REFAAT, H., F. M. MADY, H. A. SARHAN, H. S. RATEB, E. ALAAELDIN (2021): Optimization and evaluation of propolis liposomes as a promising therapeutic approach for COVID-19. *Int. J. Pharm.* 592, 120028.
217. RISTIVOJEVIĆ, P., J. TRIFKOVIĆ, F. ANDRIĆ, D. MILOJKOVIĆ-OPSENICA (2015): Poplar-type Propolis: Chemical Composition, Botanical Origin and Biological Activity. *Nat. Prod. Commun.* 10, 1869-1876.
218. ROCHA, B. A., P. C. BUENO, M. M. OLIVEIRA (2013): Evaluation of a PropolisWater Extract Using a Reliable RP-HPLC Methodology and *in vitro* and *in vivo*, Efficacy and Safety Characterisation. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2013, 670451.
219. ROMANA-SOUZA, B., J. S. DOS SANTOS, A. MONTE-ALTO-COSTA (2018): Caffeic acid phenethyl ester promotes wound healing of mice pressure ulcers affecting NF- $\kappa$ B, NOS2 and NRF2 expression. *Life Sci.* 207, 158-165.
220. ROSENKRANZ, M., J. P. SCHNITZLER (2016): Plant Volatiles. U: *Encyclopedia of Life Sciences.* (Ltd., Ur.), John Wiley & Sons, Published Online, str. 1-9.
221. ROSENKRANZ, M., Y. CHEN, P. ZHU, A. C. VLOT (2021): Volatile terpenes – mediators of plant-to-plant communication. *Plant J.*, 108, 617-631.

222. ROUBIK, D. W., B. H. SMITH, R. G. CARLSON (1987): Formic acid in caustic cephalic secretions of stingless bee, *Oxytrigona* (Hymenoptera: Apidae). *J. Chem. Ecol.* 13, 1079-1086.
223. ROUPE, K. A., C. M. REMSBERG, J. A. YANEZ, N. M. DAVIES (2006): Pharmacometrics of stilbenes: seguing towards the clinic. *Curr. Clin. Pharmacol.* 1, 81-101.
224. RUFATTO, L. C., P. LUCHTENBERG, C. GARCIA, C. THOMASSIGNY, S. BOUTTIER, J. A. P. HENRIQUES, M. ROESCH-ELY, F. DUMAS, S. MOURA (2018): Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. *Microbiol. Res.* 214, 74-82.
225. SAITO, É., P. SACODA, L. C. PAVIANI, J. T. PAULA, F. A. CABRAL (2020): Conventional and supercritical extraction of phenolic compounds from Brazilian red and green propolis. *Sep. Sci. Technol.* 56, 1-8.
226. SALATINO, A., C. C. FERNANDES-SILVA, A. A. RIGHI, M. L. F. SALATINO (2011): Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat. Prod. Rep.* 28, 925-936.
227. SALATINO, A., E. W. TEIXEIRA, G. NEGRI, D. MESSAGE (2005): Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2, 33-38.
228. SALLEH, S. N. A. S., N. A. M. HANAPIAH, W. L. W. JOHARI, H. AHMAD, N. H. OSMAN (2021): Analysis of bioactive compounds and chemical composition of Malaysian stingless bee propolis water extracts. *Saudi J. Biol. Sci.* 28, 6705-6710.
229. SALOMÃO, K., P. R. PEREIRA, L. C. CAMPOS, C. M. BORBA, P. H. CABELLO M. C. MARCUCCI, S. L. DE CASTRO (2008): Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evid. Based Complement. Alternat.* 5, 317-324.
230. SANTANA, H. F., A. A. BARBOSA, S. O. FERREIRA, H. C. MANTOVANI (2011): Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 485-491.

231. SANTOS, L. M., M. S. FONSECA, A. R. SOKOLONSKI, K. R. DEEGAN, R. P. ARAÚJO, M. A. UMSZA-GUEZ, J. D. BARBOSA, R. D. PORTELA, B. A. MACHADO (2020): Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *J. Sci. Food Agric.* 100, 1369-1382.
232. SÁ-NUNES, A., L. H. FACCIOLI, J. M. SFORCIN (2003): Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- $\gamma$  production. *J. Ethnopharmacol.* 87, 93-97.
233. SCHELLER, S., G. GAZDA, G. PIETSZ, J. GABRYS, J. SZUMLAS, L. ECKERT, J. SHANI (1988): The ability of ethanol extract of propolis to stimulate plaque formation in immunized mouse spleen cells. *Pharmacol. Res. Commun.* 20, 323-328.
234. SEIFERT, M., E. HASLINGER (1989): Über die Inhaltsstoffe der Propolis. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1989, 1123-1126.
235. SERKEDJIEVA, J., N. MANOLOVA, V. BANKOVA (1992): Anti-influenza Virus Effect of Some Propolis Constituents and Their Analogues (Esters of Substituted Cinnamic Acids). *J. Nat. Prod.* 55, 294-297.
236. SETLOW, B., P. SETLOW (1993): Binding of small, acid-soluble spore proteins to DNA plays a significant role in the resistance of *Bacillus subtilis* spores to hydrogen peroxide. *Appl. Environ. Microb.* 59, 3418-3423.
237. SFORCIN, J. M. (2016): Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytother. Res.* 30, 894-905.
238. SFORCIN, J. M., R. KANENO, S. R. C. FUNARI (2002): Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. *J. Venom. Anim. Toxins* 8, 19-29.
239. SFORCIN, J. M., R. O. ORSI, V. BANKOVA (2005): Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *J. Ethnopharmacol.* 98, 301-305.
240. SFORCIN, J. M., V. BANKOVA (2011): Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol.* 133, 253-260.
241. SHABBIR, A., M. RASHID, H. N. TIPU (2016): Propolis, A Hope for the Future in Treating Resistant Periodontal Pathogens. *Cureus* 8, e682.

242. SHARMA, V., K. G. RAMAWAT (2013): Isoflavonoids. U: Natural Products. (K. G. Ramawat, J. M. Mérillon, Ur.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, str. 1849-1865.
243. SHIMIZU, T. A. HINO, A. TSUTSUMI, K. P. YONG, W. WATANABE, M. KUROKAWA (2008): Anti-influenza virus activity of propolis *in vitro* and its efficacy against influenza infection in mice. *Antivir. Chem. Chemother.* 19, 7-13.
244. SHIRSATH, S. R., S. H. SONAWANE, P. R. GOGATE (2012): Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chem. Eng. Process.* 53, 10-23.
245. SHOUQIN, Z., X. JUN, W. CHANGZHENG (2005): High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 50-54.
246. SIHERI, W., G. U. EBILOMA, J. O. IGOLI, A. I. GRAY, M. BIDDAU, P. AKRACHALANONT, S. ALENEZI, M. A. ALWASHIH, R. EDRADA-EBEL, S. MULLER, C. E. LAWRENCE, J. FEARNLEY, D. G. WATSON, H. P. DE KONING (2019): Isolation of a Novel Flavanonol and an Alkylresorcinol with Highly Potent Anti-Trypanosomal Activity from Libyan Propolis. *Molecules* 24, 1041.
247. SIHERI, W., T. ZHANG, G. U. EBILOMA, M. BIDDAU, N. WOODS, M. Y. HUSSAIN, C. J. CLEMENTS, J. FEARNLEY, R. A. E. EBEL, T. PAGET, S. MULLER, K. C. CARTER, V. A. FERRO, H. P. DE KONING, D. G. WATSON (2016): Chemical and antimicrobial profiling of propolis from different regions within Libya. *PLoS One* 11, e0155355.
248. SILVA, M. P., T. M. SILVA, A. C. MENGARDA, M. C. SALVADORI, F. S. TEIXEIRA, S. M. ALENCAR, G. C. L. FILHO, B. BUENO-SILVA, J. DE MORAES (2021): Brazilian red propolis exhibits antiparasitic properties *in vitro* and reduces worm burden and egg production in an mouse model harboring either early or chronic *Schistosoma mansoni* infection. *J. Ethnopharmacol.* 264, 113387.
249. SILVA, R. P. D., B. A. S. MACHADO, G. A. D. A. BARRETO, S. S. COSTA, L. N. ANDRADE, R. G. AMARAL, A. A. CARVALHO, F. F. PADILHA, J. D. V. BARBOSA, M. A. UMSZA-GUEZ (2017): Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PLoS One* 12, e0172585.

250. SIMONE-FINSTROM, M. D., M. SPIVAK (2012): Increased resin collection after parasite challenge: a case of self-medication in honey bees. *PLoS One* 7, e34601.
251. SIMONS, R., H. GRUPPEN, T. F. H. BOVEE, M. A. VERBRUGGEN, J. P. VINCKEN (2012): Prenylated isoflavonoids from plants as selective estrogen receptor modulators (phytoSERMs). *Food Funct.* 3, 810.
252. SMITH, B. H., S. COBEY (1994): The olfactory memory of the honeybee *Apis mellifera*. II. Blocking between odorants in binary mixtures. *J. Exp. Biol.* 195, 91-108.
253. SOCHA, R., D. GAŁKOWSKA, M. BUGAJ, L. JUSZCZAK (2015): Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Nat. Prod. Res.* 29, 416-422.
254. SOLTANI, E. K., R. CEREZUELA, N. CHAREF, S. MEZAACHE-AICHOOR, M. A. ESTEBAN, M. M. ZERROUG (2017): Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and *in vitro* effects on gilthead seabream innate immune responses. *Fish Shellfish Immunol.* 62, 57-67.
255. SOMOGYI, A., K. ROSTA, P. PUSZTAI, Z. TULASSAY, G. NAGY (2007): Antioxidant measurements. *Physiol. Meas.* 28, 41-55.
256. STRAHL, H., J. ERRINGTON (2017): Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function. *Annu. Rev. Microbiol.* 71, 519-538.
257. SUN, G. Y., A. Y. SUN (1985): Ethanol and membrane lipids. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 9, 164-180.
258. SUN, L. P., A. L. CHEN, H. C. HUNG, Y. H. CHIEN, J. S. HUANG, C. Y. HUANG, Y. W. CHEN, C. N. CHEN (2012): Chrysin: a histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11748-11758.
259. ŠURAN, J., I. CEPANEC, T. MAŠEK, B. RADIĆ, S. RADIĆ, I. T. GAJGER, J. VLAINIĆ (2021a): Propolis Extract and Its Bioactive Compounds-From Traditional to Modern Extraction Technologies. *Molecules* 26, 2930.
260. ŠURAN, J., I. CEPANEC, T. MAŠEK, K. STARČEVIĆ, I. T. GAJGER, M. VRANJEŠ, B. RADIĆ, S. RADIĆ, I. KOSALEC, J. VLAINIĆ (2021b): Nonaqueous

- Polyethylene Glycol as a Safer Alternative to Ethanolic Propolis Extracts with Comparable Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Antioxidants* 10, 978.
261. ŠURAN, J., J. ALADROVIĆ, B. B. LJUBIĆ, J. VLAINIĆ, M. MAMIĆ, B. RADIĆ, G. BAČIĆ, N. MAČEŠIĆ, M. BENIĆ, A. KOSTELIĆ, F. BOŽIĆ, H. PAVASOVIĆ, L. RADIN (2020): The antioxidant effect of the novel bee-product based intramammary formulation Apimast® in dairy cattle. *Vet. arhiv* 90, 225-233.
262. TAKAISI-KIKUNI, N. B., H. SCHILCHER (1994): Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med.* 60, 222-227.
263. TATEFUJI, T., N. IZUMI, T. OHTA, S. ARAI, M. IKEDA, M. KURIMOTO (1996): Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biol. Pharm. Bull.* 19, 966-970.
264. TEIXEIRA, E. W., G. NEGRI, R. M. MEIRA, D. MESSAGE, A. SALATINO (2005): Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2, 85-92.
265. TEPONNO, R. B., S. KUSARI, M. SPITELLER (2016): Recent advances in research on lignans and neolignans. *Nat. Prod. Rep.* 33, 1044-1092.
266. TETALI, S. D. (2018): Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. *Planta* 249, 1-8.
267. TLAK GAJGER, I., I. PAVLOVIĆ, M. BOJIĆ, I. KOSALEC, S. SREČEC, T. VLAINIĆ, J. VLAINIĆ (2017): Components responsible for antimicrobial activity of propolis from continental and Mediterranean regions in Croatia. *Czech J. Food Sci.* 35, 376-385.
268. TLAK GAJGER, I., S. A. DAR (2021): Plant allelochemicals as sources of insecticides. *Insects* 12, 189.
269. TOBALDINI-VALERIO, F. K., P. S. BONFIM-MENDONÇA, H. C. ROSSETO, M. L. BRUSCHI, M. HENRIQUES, M. NEGRI, S. SILVA T. SVIDZINSKI (2016): Propolis: a potential natural product to fight *Candida* species infections. *Future Microbiol.* 11, 1035-1046.



270. TORRES, A. R., L. P. SANDJO, M. T. FRIEDEMANN, M. M. TOMAZZOLI, M. MARASCHIN, C. F. MELLO, A. R. S. SANTOS (2018): Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 51, e7118.
271. TRUSHEVA, B., D. TRUNKOVA, V. BANKOVA (2007): Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chem. Cent. J.* 1, 13.
272. TRUSHEVA, B., H. PETKOV, M. POPOVA, L. DIMITROVA, M. ZAHARIEVA, I. TSVETKOVA, H. NAJDENSKI, V. BANKOVA (2019): "Green" approach to propolis extraction: Natural deep eutectic solvents. *C. R. Acad. Bulg. Sci.* 72, 897-905.
273. TRUSHEVA, B., I. TODOROV, M. NINOVA, H. NAJDENSKI, A. DANESHMAND, V. BANKOVA (2010): Antibacterial mono- and sesquiterpene esters of benzoic acids from Iranian propolis. *Chem. Cent. J.* 4, 8.
274. TRUSHEVA, B., M. POPOVA, E. B. KOENDHORI, I. TSVETKOVA, C. NAYDENSKI, V. BANKOVA (2011): Indonesian propolis: chemical composition, biological activity and botanical origin. *Nat. Prod. Res.* 25, 606-613.
275. TSIBRANSKA, I. H., B. TYLKOWSKI, G. A. PEEV, M. GIAMBERINI, R. GARCIA-VALLS (2012): Mass transfer kinetics of biologically active compounds from Propolis. *Bulg. Chem. Commun.* 44, 64-69.
276. TULLOCH, A. P. (1970): The composition of beeswax and other waxes secreted by insects. *Lipids* 5, 247-258.
277. TYPAS, A., V. SOURJIK (2015): Bacterial protein networks: Properties and functions. *Nat. Rev. Genet.* 13, 559-572.
278. UZEL, A., K. SORKUN, Ö. ÖNÇAĞ, D. ÇOĞULU, Ö. GENÇAY, B. SALI'H (2005): Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol. Res.* 160, 189-195.
279. VALCIC, S., G. MONTENEGRO, B. N. TIMMERMANN (1998): Lignans from Chilean propolis. *J. Nat. Prod.* 61, 771-775.

280. VASCONCELOS, N. G., J. CRODA, S. SIMIONATTO (2018): Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microb. Pathog.* 120, 198-203.
281. VENKATESAN, N., G. PERUMAL, M. DOBLE (2015): Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. *Future Microbiol.* 10, 1743-1750.
282. VIVIERS, H. J., A. PETZER, R. GORDON (2022): An assessment of solvent residue contaminants related to cannabis-based products in the South African market. *J. Cannabis Res.* 4, 19.
283. WAGH, V. D. (2013): Propolis: A wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2013, 308249.
284. WALKER, P., E. CRANE (1987): Constituents of propolis. *Apidologie* 18, 327-334.
285. WANG, J., X. FANG, L. GE, F. CAO, L. ZHAO, Z. WANG, W. XIAO (2018): Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol. *PLoS One* 13, e0197563.
286. WEI, S. D., Y. M. LIN, M. M. LIAO, H. C. ZHOU, Y. Y. LI (2012): Characterization and antioxidative properties of condensed tannins from the mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. *J. Appl. Polym. Sci.* 124, 2463-2472.
287. WELLINGTON, E., D. WILSON, R. PATRICIA, R. PEIXOTO, J. TENÓRIO, T. SILVA, M. MATEUS (2015): *In vitro* activity of propolis: Synergism in combination with antibiotics against *Staphylococcus* spp. *Afr. J. Microbiol. Res.* 9, 1-5.
288. WOŁAWEK-POTOCKA, I., C. MANNELLI, D. BORUSZEWSKA, I. KOWALCZYK-ZIEBA, T. WAŚNIEWSKI, D. J. SKARŻYŃSKI (2013): Diverse effects of phytoestrogens on the reproductive performance: cow as a model. *Int. J. Endocrinol.* 2013, 650984.
289. WOŹNIAK, M., L. MRÓWCZYŃSKA, P. KWAŚNIEWSKA-SIP, A. WAŚKIEWICZ, P. NOWAK, I. RATAJCZAK (2020): Effect of the Solvent on Propolis Phenolic Profile and its Antifungal, Antioxidant, and *In vitro* Cytoprotective Activity in Human Erythrocytes Under Oxidative Stress. *Molecules* 25, 4266.

290. WU, T., X. ZANG, M. HE, S. PAN, X. XU (2013): Structure–Activity Relationship of Flavonoids on Their Anti-*Escherichia coli* Activity and Inhibition of DNA Gyrase. *J. Agric. Food Chem.* 61, 8185-8190.
291. XUAN, H., W. YUAN, H. CHANG, M. LIU, F. HU (2018): Anti-inflammatory effects of Chinese propolis in lipopolysaccharide-stimulated human umbilical vein endothelial cells by suppressing autophagy and MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Inflammopharmacology* 27, 561-571.
292. YOSHIMASU, Y., T. IKEDA, N. SAKAI, A. YAGI, S. HIRAYAMA, Y. MORINAGA, S. FURUKAWA, R. NAKAO (2018): Rapid Bactericidal Action of Propolis against *Porphyromonas gingivalis*. *J. Dent. Res.* 97, 928-936.
293. YUAN, J., W. YUAN, Y. GUO, Q. WU, F. WANG, H. XUAN (2022): Anti-Biofilm Activities of Chinese Poplar Propolis Essential Oil against *Streptococcus mutans*. *Nutrients* 14, 3290.
294. ZHANG, J., X. SHEN, K. WANG, X. CAO, C. ZHANG, H. ZHENG, F. HU (2016): Antioxidant activities and molecular mechanisms of the ethanol extracts of *Baccharis* propolis and *Eucalyptus* propolis in RAW64.7 cells. *Pharm. Biol.* 54, 2220-2235.
295. ZHANG, W., G. E. MARGARITA, D. WU, W. YUAN, S. YAN, S. QI, X. XUE, K. WANG, L. WU (2022): Antibacterial Activity of Chinese Red Propolis against *Staphylococcus aureus* and MRSA. *Molecules* 27, 1693.
296. ZHANG, W., Y. CAI, X. CHEN, T. JI, L. SUN (2020): Optimized extraction based on the terpenoids of *Heterotrigona itama* propolis and their antioxidative and anti-inflammatory activities. *J. Food Biochem.* 44, e13296.
297. ZHAO, L., M. YU, M. SUN, X. XUE, T. WANG, W. CAO, L. SUN (2017): Rapid Determination of Major Compounds in the Ethanol Extract of Geopropolis from Malaysian Stingless Bees, *Heterotrigona itama*, by UHPLC-Q-TOF/MS and NMR. *Molecules* 22, 1935.
298. ZHOU, Y., J. WANG, Y. CHANG, R. LI, X. SUN, L. PENG, W. ZHENG, W. QIU, W. (2020): Caffeic Acid Phenethyl Ester Protects against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Regulating T Cell Activities. *Oxid. Me. Cell Longev.* 2020, 1-13.

299. ZULHENDRI, F., K. CHANDRASEKARAN, M. KOWACZ, M. RAVALIA, K. KRIPAL, J. FEARNLEY, C. O. PERERA (2021): Antiviral, Antibacterial, Antifungal, and Antiparasitic Properties of Propolis: A Review. *Foods* 10, 1360.
300. ZWENGER, S., C. BASU (2008): Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 3, 1-7.

## 8. SAŽETAK

### Mehanizmi antibakterijskog djelovanja inovativnog ekstrakta propolisa

*Mihaela Vranješ*

Propolis je pčelinji proizvod poznat ljudima više od dvije tisuće godina. Njegova su antimikrobna svojstva bila predmet brojnih istraživanja u kojima su se najčešće koristili alkoholni (etanolni) ekstrakti propolisa. Iako učinkoviti i često korišteni, takvi ekstrakti zbog učinka etanola nisu primjereni za uporabu kod određenih stanja i pacijenata u humanoj i veterinarskoj medicini. Potaknuti navedenim činjenicama smo u našem istraživanju koristili bezalkoholni, standardizirani i neškodljivi ekstrakt propolisa. Cilj nam je bio utvrditi njegovu antimikrobnu učinkovitost prema bakteriji *S. aureus* i gljivici *C. albicans* te mehanizme njegovog antibakterijskog djelovanja. Koncentracije aktivnih tvari u ekstraktu smo odredili HPLC metodom, a zatim smo nizom mikrobioloških postupaka istražili njegovo djelovanje prema ispitivanim mikroorganizmima. Bezalkoholni ekstrakt propolisa je uz flavonoide sadržavao feruličnu kiselinu, *para*-kumarinsku kiselinu, kavenu kiselinu i CAPE. Minimalna inhibicijska koncentracija (MIK) propolisa za bakteriju *S. aureus* iznosila je 0,883 % i 1,324 % propolisa, a za gljivicu *C. albicans* 0,883 % propolisa. Mjerenjem koncentracije proteina i dvolančane DNK u izvanstaničnom matriksu nakon primjene propolisa na *S. aureus* smo potvrdili da su nastale promjene u bakterijskoj membrani i stijenci zbog kojih je došlo do istjecanja unutarstaničnog materijala u izvanstanični matriks. Također, provođenjem metode dinamičke procjene antimikrobne aktivnosti smo zaključili da propolis na *S. aureus* djeluje baktericidno, a na *C. albicans* mikostatski. Zaključno, istraživanjem smo dokazali da standardizirani i bezalkoholni ekstrakt propolisa narušava cjelovitost bakterijske membrane i stijenke te da uzrokuje izlazak staničnog materijala (proteina i dvolančane DNK) bakterije *S. aureus*. Osim toga, dokazali smo i mikostatsko djelovanje ekstrakta na gljivicu *C. albicans* čime je potvrđen puni antimikrobni potencijal inovativnog ekstrakta propolisa. Dobiveni rezultati mogu poslužiti kao korisna osnova za provođenje daljnjih istraživanja i moguću komercijalnu primjenu.

Ključne riječi: bezalkoholni ekstrakt propolisa, mehanizam djelovanja, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*

## 9. SUMMARY

### Antibacterial action mechanisms of innovative propolis extract

*Mihaela Vranješ*

Propolis is a bee product known to humans for over two thousand years. Its antimicrobial properties have been the subject of numerous studies, with alcohol-based (ethanol) propolis extracts being the most commonly used. Although effective and frequently utilized, such extracts are not suitable for some conditions and patients in human and veterinary medicine due to the effects of ethanol. Motivated by these facts, our research employed an alcohol-free, standardized and harmless propolis extract. We aimed to determine its antimicrobial effectiveness against the bacterium *S. aureus* and the fungus *C. albicans*, as well as to explore the mechanisms of its antibacterial action. We determined the concentrations of active substances in the extract using the HPLC method and then examined its effects on the test microorganisms through a series of microbiological procedures. In addition to flavonoids, the alcohol-free propolis extract contained ferulic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, and CAPE. The minimum inhibitory concentration (MIC) of propolis against *S. aureus* was 0.883 % and 1.324 % propolis, while against *C. albicans*, it was 0.883 % propolis. By measuring the concentration of proteins and double-stranded DNA (dsDNA) in the extracellular matrix after applying propolis to *S. aureus*, we confirmed that changes occurred in the bacterial membrane and cell wall, leading to the leakage of intracellular material into the extracellular matrix. Furthermore, by employing a *time-kill assay*, we concluded that propolis has a bactericidal effect on *S. aureus* and a fungistatic effect on *C. albicans*. In conclusion, our research has demonstrated that the standardized and alcohol-free propolis extract disrupts the integrity of the bacterial membrane and cell wall, causing the release of cellular material (proteins and double-stranded DNA) from *S. aureus*. Additionally, we have proven the fungistatic activity of the extract against the fungus *C. albicans*, thus confirming the full antimicrobial potential of the alcohol-free propolis extract. The obtained results can serve as a valuable basis for further research and potential commercial applications.

Key words: alcohol-free propolis extract, mechanism of action, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 30. siječnja 1997. godine u Osijeku. Nakon završetka III. gimnazije u Osijeku s odličnim uspjehom sam 2015. godine upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Tijekom studiranja zanimala su me brojne dodatne fakultetske aktivnosti koje su uključivale demonstraturu na Zavodu za fiziku, Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju, Zavodu za patofiziologiju, Zavodu za farmakologiju i toksikologiju te volontiranje na Zavodu za veterinarsku biologiju. Izvan fakulteta sam u svrhu provedbe znanstvenog istraživanja radila u laboratoriju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, a tijekom ljeta sam volontirala kao tumač biologije i istraživanja morskih sisavaca u Udruzi za zaštitu prirode *Val*. Kliničko iskustvo sam osim na nastavi stjecala i volontiranjem na Klinici za unutarnje bolesti, Klinici za porodništvo i reprodukciju domaćih životinja te u ambulantomama u rodnom gradu.

Uz ostvarivanje CEEPUS stipendija sudjelovala sam i na studentskim razmjenama. Mjesec dana sam provela na Kliničkom odjelu anesteziologije i perioperativne intenzivne skrbi Veterinarskog sveučilišta u Beču, a nakon toga sam mjesec dana bila i na Klinici za konje Veterinarskog fakulteta u Budimpešti.

Pohađala sam nekoliko hrvatskih i međunarodnih kongresa među kojima bih istaknula *4<sup>th</sup> European Veterinary Congress of Behavioural Medicine and Animal Welfare* održan u gradu Palma de Mallorca u Španjolskoj. Na nekim kongresima sam i volontirala, a sudjelovala sam u organizaciji *32. generalne skupštine EAEVE-a* u Zagrebu i *10. međunarodnog kongresa biologije jelena* održanog u Osijeku. Na *4. Poklukarjevim dnevima* sam održala izlaganje teme diplomskog rada pod nazivom *Mehanizmi antibakterijskog djelovanja inovativnog ekstrakta propolisa*.

U suradnji s kolegama sam napisala nekoliko znanstvenih radova. Radovi *Karakteristike parazitarnih oboljenja kitova* (pod mentorstvom prof. dr. sc. Tomislava Gomerčića) i *Biomarkeri propolisa i njihova povezanost s antimikrobnim i antioksidacijskim učinkom* (pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Jelene Šuran) bili su prijavljeni za dodjelu Rektorove nagrade. Također, jedan sam od autora rada pod nazivom *Nonaqueous Polyethylene Glycol as a Safer Alternative to Ethanolic Propolis Extracts with Comparable Antioxidant and Antimicrobial Activity* koji je objavljen u časopisu *Antioxidants*.

Od početka 2018. godine bila sam članica uredničkog odbora studentskog časopisa *Veterinar*, a ulogu glavne urednice preuzela sam u prosincu 2019. godine. Pod mojim vodstvom objavljeno je pet brojeva, a ukupno sam sudjelovala u objavi deset brojeva spomenutog časopisa. U 2019. godini sam sudjelovala na projektu pod nazivom *Plavi projekt - doprinos razvoju programa društveno korisnog učenja na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu* u okviru kojeg sam u Šibeniku provela edukaciju lokalnog stanovništva o nadzoru kritičnih staništa za morske kornjače i o njihovom zbrinjavanju.

Osim u stručno-znanstvenom području bila sam i u predstavničkim tijelima studenata. Bila sam predstavnica godine na 3., 4. i 5. godini studija, članica Studentskog zbora te članica Povjerenstva za integrirani preddiplomski i diplomski studij i Povjerenstva za medije i odnose s javnošću.

U šest godina studiranja ostvarila sam ukupni prosjek ocjena 4,949 te sam za svoje rezultate nagrađena stipendijama i nagradama. Među nagradama bih istaknula Rektorovu nagradu za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici (2018. godine), Dekanovu nagradu za marljivost i ostvarivanje uzornih rezultata u studiranju (2019. godine), Dekanove nagrade za izvrstan uspjeh (2016., 2018., 2020. i 2021. godine) i Godišnju nagradu Genere d.o.o. (2020. godine).