

Kemijska karakterizacija i varijacije u sastavu sirovog propolisa u pčelinjoj zajednici (*Apis mellifera* L.)

Jerman, Soledad-Dea

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:884382>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**Kemijska karakterizacija i varijacije u sastavu
sirovog propolisa u pčelinjoj zajednici
(*Apis mellifera* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Soledad-Dea Jerman

Zagreb, rujan, 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:
Ekološka poljoprivreda i agroturizam

**Kemijska karakterizacija i varijacije u sastavu
sirovog propolisa u pčelinjoj zajednici
(*Apis mellifera* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Soledad-Dea Jerman

Mentor: doc. dr. sc. Lidija Svečnjak

Neposredni voditelj: dr. sc. Saša Prđun

Zagreb, rujan, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, Soledad-Dea Jerman , JMBAG 0058201683, rođen/a dana 20.05.1993. u Zagrebu,
izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Kemijska karakterizacija i varijacije u sastavu sirovog
propolisa u pčelinjoj zajednici (*Apis mellifera* L.)

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice Soledad-Dee Jerman , JMBAG 0058201683, naslova

Kemijska karakterizacija i varijacije u sastavu sirovog

propolisa u pčelinjoj zajednici (*Apis mellifera* L.)

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:

potpisi:

doc. dr. sc. Lidija Svečnjak

mentor

dr. sc. Saša Prđun

neposredni voditelj

prof. dr. sc. Dragan Bubalo

član

izv. prof. dr. sc. Marko Vinceković

član

Zahvala

Ovime zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Lidiji Svečnjak koja me sa strpljenjem i lakoćom vodila kroz identifikaciju sakupljenih uzoraka i pisanje ovog dipomskog rada te se u potpunosti prilagodila mojem slobodnom vremenu i radnim satima. Također, zahvaljujem i neposrednom voditelju dr. sc. Saši Prđunu s kojim je sakupljanje uzoraka u trajanju od četiri mjeseca prošlo zaista brzo.

Posebno bih se željela zahvaliti svojim roditeljima koji sa strpljenjem iščekuju ovaj dan. Proteklih godina bili su velika podrška i uvijek puni pozitivnih komentara. Hvala na strpljenju i razumijevanju. Isplatilo se čekati, zar ne?

No ipak, svoju najveću zahvalu dugujem, sada već, svojem mužu Ivanu koji je cijelo moje fakultetsko obrazovanje prošao sa mnom. Od prvih položenih i nepoloženih ispita, pa sve do zadnje ocjene upisane u index. Bio je prisutan i prilikom veselja i prilikom plakanja, uvijek pun razumijevanja i podrške. Hvala ti srećo.

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Soledad-Dee Jerman**, naslova

Kemijska karakterizacija i varijacije u sastavu sirovog
propolisa u pčelinjoj zajednici (*Apis mellifera* L.)

Propolis je biljni materijal koji radilice skupljaju s pupova različitih biljnih vrsta, miješaju ga s voskom te ga koriste u konstrukciji i adaptaciji košnice. Cilj ovoga rada bio je provesti kemijsku karakterizaciju propolisa na razini pčelinje zajednice prateći varijacije sastava propolisa unesenog na različite pozicije u košnici (plodište, medište) tijekom proizvodne sezone na dvije pokusne lokacije, kako bi se utvrdile razlike u kemijskom sastavu u ovisnosti o botaničkom i zemljopisnom podrijetlu propolisa. Uzorkovanje je bilo provedeno tijekom razdoblja travanj - kolovoz 2018. godine, pri čemu je prikupljeno ukupno 180 uzoraka sirovog propolisa iz 10 pokusnih pčelinjih zajednica na lokaciji Pčelinjak (Agronomski fakultet) i Prolom (lovište). Uzorci su analizirani metodom FTIR-ATR spektroskopije. Kvalitativnom obradom spektralnih podataka utvrđeno je kako radilice ne unose propolis na različite pozicije u košnici u ovisnosti o kemijskom sastavu, kako postoji korelacija između udjela balzamskih tvari i pčelinjeg voska u uzorcima propolisa unesenih u zajednice na početku i na kraju sezone te kako su radilice tijekom sezone unosile smolaste i balzamske tvari različitih biljnih vrsta.

Ključne riječi: propolis, kemijska karakterizacija, botaničko i zemljopisno podrijetlo, FTIR-ATR spektroskopija

Summary

Of the master's thesis - student **Soledad-Dea Jerman**, entitled

Chemical characterization and variations in the composition of raw propolis
in the honey bee colony (*Apis mellifera* L.)

Propolis is the generic name for the resinous substance collected by honeybees from various plant sources, mixed with beeswax and used as a construction and adaptation material in the hive. The aim of this study was to perform the chemical characterization of propolis on the honey bee level following the compositional variation of propolis introduced into different position in the hive (brood comb, honey comb) during the production season at two experimental locations, in order to determine differences in chemical composition according to botanical and geographical origin of propolis. Sampling was carried out during April - August period in 2018; a total of 180 raw propolis samples from ten experimental honey bee colonies were collected at Apiary (Faculty of Agriculture) and Prolom (hunting ground) location. Samples were analyzed using FTIR- ATR spectroscopy. The results of the qualitative processing of spectral data showed that workers do not introduce propolis in the various position in the hive depending on the chemical composition. The results also revealed a correlation between the proportion of balsamic matter and beeswax in the propolis samples introduced into the honey bee colonies at the beginning and at the end of the season, and also, that they have introduced balsamic matter of different plant species during the season.

Keywords: propolis, chemical characterization, botanical and geographical origin, FTIR-ATR spectroscopy

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	Cilj rada	1
2.	Pregled literature	2
2.1.	Propolis.....	2
2.2.	Skupljanje propolisa	2
2.3.	Sastav i izvor propolisa.....	3
2.3.1.	<i>Biljni izvori propolisa u umjereno toploj klimatskoj zoni</i>	4
2.3.2.	<i>Biljni izvori tropskog propolisa</i>	4
2.4.	Fizikalno-kemijska i organoleptička svojstva propolisa	5
2.5.	Istraživanja kemijskog sastava propolisa	6
2.6.	Analitičke metode za određivanja kemijskog sastava propolisa	9
2.7.	Infracrvena (IR) spektroskopija.....	11
2.7.1.	FTIR-ATR- spektroskopija	11
3.	Materijali i metode	13
3.1.	Uzorkovanje.....	13
3.2.	Odabir pokusnih pčelinjih zajednica	13
3.3.	Metoda prikupljanja propolisa.....	14
3.4.	Analiza uzoraka propolisa metodom FTIR-ATR spektroskopije.....	14
3.5.	Obrada i analiza spektralnih podataka	16
4.	Rezultati i rasprava.....	17
4.2.	Rezultati analize propolisa metodom FTIR-ATR spektroskopije	17
4.2.2.	Rezultati analize propolisa unesenog na različite pozicije u košnici	19
4.2.3.	Rezultati analize propolisa prikupljenog tijekom proizvodne sezone (razdoblje travanj-kolovoz)	21
4.2.4.	Rezultati analize propolisa s obzirom na lokaciju.....	23
5.	Zaključci.....	26
6.	Literatura	27
7.	Životopis.....	31

1. Uvod

Propolis predstavlja smolaste i balzamske tvari koje obavijaju pupove uglavnom drvenastih biljnih vrsta, a skupljaju ga specijalizirane pčele radilice (*Apis mellifera* L.) koje ga u košnici koriste kao materijal za konstrukciju i kao antiseptik. Pčele ga skupljaju i miješaju sa sekretom čeljusnih žlijezda, enzimski ga modificiraju tako da najvažnije sastavnice, poput polifenola i flavonola, postaju farmakološki djelatne tvari. Kemijski sastav propolisa, kao i sadržaj njegovih biološki aktivnih sastavnica se znatno razlikuju ovisno o podrijetlu biljke s koje su skupljane smolaste i balzamske tvari. Sastav propolisa može se podijeliti na balzamski dio (~40-70 %) koji potječe od prikupljenog dijela s biljaka, i nebalzamski dio (~20-35 %) koji dodaju pčele. Međutim, u dostupnoj znanstvenoj literaturi nema dovoljno podataka o utjecaju botaničkog i zemljopisnog podrijetla propolisa na njegov kemijski sastav te o razlikama u sastavu između pčelinjih zajednica. Sastavnice ekstrakta propolisa sustavno se istražuju već nekoliko desetljeća, no prema podacima iz dostupne znanstvene literature, detaljna kemijska karakterizacija sirovog propolisa nije provedena. S obzirom na veliki interes za ispitivanjem kemijskog sastava i farmakoloških svojstava propolisa u sinergiji s primjenom prirodnih proizvoda u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, ispitivanje kemijskog sastava sirovog propolisa je također predmet interesa.

Za istraživanje propolisa primijenjeni su mnogi analitički alati, ali se metoda infracrvene (engl. *infrared* - IR) spektroskopije pokazala posebno pouzdanom i preciznom. IR spektar nosi informaciju o ukupnom kemijskom sastavu kroz vibracije funkcionalnih skupina molekula, a položaj i intenzitet apsorpcijskih vrpca neke tvari su njene specifične odlike (Günzler i Gremlich, 2006). Tipičan IR spektar alkoholnog ekstrakta propolisa (snimljen spektroskopijom u infracrvenom dijelu spektra s Fourierovom transformacijom i ATR tehnikom snimanja: FTIR-ATR) prvi su prikazali Wu i sur. (2008), otvorivši vrata novim znanstvenim spoznajama. Osim fenolnog profila i sadržaja ukupnih fenola i flavonoida, osnovni pokazatelj kakvoće propolisa je i antioksidativni kapacitet. Međutim, kemijska karakterizacija sirovog propolisa dosad nije provedena.

Uzimajući u obzir teorijske postavke kao i rezultate dosadašnjih ispitivanja, daljnja ispitivanja vezana za primjenu IR spektroskopije u svrhu karakterizacije kemijskog sastava sirovog propolisa i njegovih varijacija, predstavlja znanstveni izazov.

1.1. Cilj rada

Cilj je ovog rada bio provesti kemijsku karakterizaciju propolisa na razini pčelinje zajednice prateći varijacije sastava propolisa unesenog na različite pozicije u košnici tijekom proizvodne sezone na dvije pokusne lokacije, kako bi se utvrdile razlike u kemijskom sastavu u ovisnosti o botaničkom i zemljopisnom podrijetlu propolisa. Pretpostavlja se da će se na temelju varijacija IR spektara uzoraka sirovog propolisa utvrditi navedene razlike u kemijskom sastavu.

2. Pregled literature

2.1. Propolis

Propolis (pčelinje ljepilo) je ljepljiv tamno obojen biljni materijal koji radilice skupljaju s pupova različitih biljnih vrsta, miješaju ga s voskom te ga koriste u gradnji i adaptaciji košnice (Burdock, 1998), uglavnom za popunjavanje pukotina i rupa što pomaže u obrani od mikroorganizama, insekata i nepovoljnih vremenskih uvjeta (Ghisalberti, 1979). Riječ propolis potječe od grčkih riječi: "pro" (ispred, pred) i "polis" (grad). Značenje "ispred grada" dobro opisuje zaštitnu ulogu propolisa u pčelinjoj zajednici. Također, prema grčkom jeziku propolis znači i ljepilo te tako opisuje i njegovu funkciju. U drevnom Egiptu je također bio poznat po funkciji ljepila, a u Grčkoj se, kako Aristotel navodi u svojem djelu "*Historia animalium*", koristio kao lijek za modrice i čireve (Bogdanov, 2017).

Propolis se od davnih vremena koristi u narodnoj medicini, a i danas je poznat po antibakterijskim, antitumorskim, antioksidativnim te drugim korisnim aktivnim svojstvima (Burdock, 1998). Štoviše, danas se koristi kao prirodni dodatak hrani, kao funkcionalni sastojak hrane te kao sastavni dio prirodne kozmetike (Anđelković i sur., 2016). Međutim, zabilježen je i njegov alergijski potencijal, što je dijelom uzrokovano određenim derivatima kafeinske kiseline koja je istodobno povezana s ranije spomenutim blagotvornim učinkom (Bertrams, 2013). Biološka aktivnost propolisa također ovisi o kemijskom sastavu te drugim čimbenicima kao što su vrsta pčela i njihova genetska varijabilnost, zemljopisno područje, raznolikost biljnih vrsta oko pčelinjaka te klimatski čimbenici (do Nascimento i Da Silva, 2016).

2.2. Skupljanje propolisa

Skupljanje propolisa u pčelinjoj zajednici obavljaju specijalizirane radilice tijekom zadnje faze njihova života. Nakon 21. dana života specijalizirane pčele radilice postaju skupljačice koje iz prirode donose nektar, mednu rosu, pelud, vodu i smolaste i balzamske tvari koje prerađuju u propolis. U najtoplijem dijelu dana skupljačice pronalaze biljke koje su izrazito bogate balzamskim i smolastim tvarima, uz pomoć mandibula (čeljusti) otkidaju dijelove smole s pupoljaka te ih smještaju u košarice stražnjih nogu. Prema nekim istraživanjima one se isključivo posvećuju skupljanju i preradi propolisa prekidajući tu aktivnost samo u slučajevima povećane potrebe za skupljanjem nektara (Kezić i sur., 2013). Skupljaju smolu tijekom toplijeg djela dana, jer je tada smola mekana, i miješaju s izlučevinama žlijezde slinovnice koja sadrži enzime (Ristivojević, 2014). Tijekom jednog leta pčela skupljačica prikupi približno 10 mg smolastih i balzamskih tvari koje nosi u košaricama stražnjih nogu (slika 1), a iz jedne pčelinje zajednice je godišnje u prosjeku moguće skupiti 50 do 150 g propolisa (Simone-Finstrom i Spivak, 2010).

Ako su pojedini izvori smole potrebni za kemijsku analizu, smola se može prikupiti iz tkiva biljke ili od pčela skupljačica, dok se skupljanje propolisa iz pčelinjih zajednica može vršiti pomoću skupljača propolisa (mrežica), prikazanih na slici 2. Obično su to guste plastične folije s nizom urezanih proreza (1,6 mm) preko cijele površine koje se izrežu na dimenzije nastavka košnice (Bankova i sur., 2016). Također, kao skupljač propolisa može

poslužiti i uokvirena žičana mreža od nehrđajućeg materijala te plastična ili silikonska mreža. Najveće količine propolisa pčelari mogu prikupiti u ljetnim mjesecima kada pčelinje zajednice počinju intenzivnije unositi smolaste i balzamske tvari u košnicu. Skupljač se postavlja na satonoše gornjeg plodišnog nastavka (iznad legla) pri čemu se krov košnice odigne nekoliko milimetara te dolazi do strujanja zraka kroz košnicu. Uslijed takvih nepovoljnih uvjeta za pčele, one nastoje zatvoriti prostor na skupljačima te isti popunjavaju propolisom.



Slika 1. Skupljačica s propolisom
prikupljenim u košaricama stražnjih nogu
izvor: FAO, 1996.



Slika 2 Mrežica za skupljanje
propolisa u košnici
izvor: FAO, 1996.

2.3.Sastav i izvor propolisa

Budući da botanički izvor propolisa uvelike ovisi o specifičnostima zemljopisnog položaja, klime i vegetacije, postoji velika razlika u njegovom kemijskom sastavu. Kao što je prethodno spomenuto, propolis se uglavnom sastoji od biljnih smola i izlučevina koje skupljaju pčele, a prosječan kemijski sastav propolisa prikupljenog s topole kao najučestalijeg izvora, prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Kemijski sastav propolisa prikupljenog s topole

Sastavnica	Udio (%)
Biljne smole i balzami	40 - 70
Vosak	20 - 35
Esencijalna i aromatska ulja	10
Pelud	5
Različite organske tvari:	5
<i>Pepeo</i>	2,1
<i>Polisaharidi</i>	2
<i>Proteini, aminokiseline, amini i amidi</i>	0,7

Izvor: Bogdanov S. (2016).

Nekoliko stotina različitih spojeva pronađeno je u različitim vrstama propolisa. Tipične komponente biljnih smola i balzama su fenoli: flavonoid aglikoni (flavoni i flavanoni), fenolne kiseline i njihovi esteri, kao isparljivi spojevi (Bogdanov, 2016).

2.3.1. Biljni izvori propolisa u umjereno toploj klimatskoj zoni

Glavni izvori smolastih i balzamski tvari u umjereno toploj klimatskoj zoni su topole. Europski propolis iz Albanije, Bugarske, Grčke, Mađarske, Italije, Rusije, Malte, Nizozemske, Poljske, Turske i Švicarske potječe upravo od raznih vrsta topola kao što su *Populus nigra* L. spp. *nigra*, *P. nigra* L. 'Italica', *P. tremula* L., *P. x canadensis* Moench, *P. alba* L., i *P. Tremuloides* Michx (Bertrams, 2013). U dostupnoj se literaturi navode i druge biljne vrste bogate smolom kao što su breza, divlji kesten, joha, jasen, šljiva, trešnja, vrba, brijest, hrast, bor, jela, ariš i mnoge druge biljne vrste (Kezić i sur., 2013). Na području Republike Hrvatske pčele u kontinentalnom području smolaste i balzamske tvari skupljaju s drvenastih biljnih vrsta poput topole (*Populus* spp.), divljeg kestena (*Aesculus hippocastanum* L.), johe (*Alnus glutinosa* L. i *A. incana* L.), poljskog jasena (*Fraxinus angustifolia* Vahl), breze (*Betula* spp), hrasta (*Quercus* spp.) te raznih vrsta vrba (*Salix* spp.), dok u mediteranskom području skupljaju uglavnom sa čempresa (*Cupressus sempervirens* L.), alepskog bora (*Pinus halepensis* Miller), crnog jasena (*Fraxinus ornus* L.), hrasta crnike (*Quercus ilex* L.) i masline (*Olea europaea* L.) (Kosalec, 2003).

Ruski znanstvenik Popravko prvi je predstavio kemijske dokaze botaničkog podrijetla propolisa. Analizirao je flavonoidni sastav propolisa i uspoređivao ga s onima kojeg izlučuju pupoljci topole i breze (Marcucci, 1995). Huang, Zhang i sur. su 2014. godine objavili rad o napretku prilikom istraživanja kemijskog sastava propolisa, u kojem su identificirali preko 500 sastavnica u propolisu te zaključili kako vrsta pčele kao i botaničko podrijetlo biljaka koje se nalaze oko košnica, također utječu na njegov kemijski sastav, a Ristivojević i sur. (2015) kemijski dokazuju kako su pupoljci svih vrsta topola glavni izvor smolastih i balzamskih tvari na području Srbije. To vrijedi za Europu, Sjevernu Ameriku i umjereni dio Azije (Bogdanov, 2016). U Rusiji, a naročito u njezinim sjevernim dijelovima, uz topolu glavni izvori smolastih i balzamskih tvari za radilice su pupoljci breze (*Betula verrucosa*, *B. pubescens* i *B. litwinowii*) (Isidorov i sur., 2014). Nasuprot tome, mediteranski propolis proizveden na Malti potječe od čempresa (Popova i sur., 2012). U Kini radilice također koriste različite vrste borova, čempresa i vrba (Lihong, 2009). U Turskoj je najučestaliji propolis topola tipa, ali ga radilice također mogu skupiti i s drugih izvora, kao što su bor, eukaliptus i kesten (Kartal i sur., 2002).

2.3.2. Biljni izvori tropskog propolisa

Najpopularniji tip tropskog propolisa, zeleni brazilski propolis, potječe iz lišća drvenstih biljnih vrsta *Baccharis dracunculifolia*, a može se naći u Argentini, Urugvaju, Čileu, Peruu i Paragvaju. Crveni propolis pčele skupljaju na Kubi, u Meksiku i Brazilu s vrsta roda *Dalbergia* (palisandrovina) koju karakterizira prisutnost izoflavonoida. Još jedan tip tropskog propolisa je onaj koji potječe od smole koja se luči iz cvijeća različitih vrsta roda *Clusia* (kluzija), a pronađena je na Kubi i u Venezueli. Glavni sastojci tog tipa propolisa su

prenilirani benzofenoni. Na tropskim otocima u Tihom oceanu (Tajvan, Okinawa, Indonezija) postoji specifičan tip propolisa, poznat kao "Pacifički propolis". On sadrži prenilirane flavanone (propoline) kao glavne sastojke, a izvor je plod tropskog drveta *Macaranga tanarius* (engl. *macaranga*) (Bogdanov, 2016). Podrijetlo i sastav različitih tipova propolisa prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Podrijetlo i sastav različitih tipova propolisa

Tip propolisa	Zemljopisno porijeklo	Biljni izvor	Sastav
Topola	Europa, Sjeverna Amerika, netropski dio Azije i Novi Zeland	<i>Populus</i> spp. , najčešće <i>P. nigra</i> L.	Flavoni, flavanoni, cimetne kiseline i njihovi esteri
Zeleni	Brazil	<i>Baccharis</i> spp., <i>B. dracunculifolia</i>	Prenilirane p-kumarinska kiselina, diterpenske kiseline
Breza	Rusija	<i>Betula verrucosa</i> Ehrh.	Flavoni i flavonoli (ne isti kao u tipu topole)
Crveni	Kuba, Brazil, Meksiko	<i>Dalbergia</i> spp.	Izoflavonoidi
Mediterranski	Sicilija, Grčka, Kreta, Malta	Cupressaceae (neidentificirane vrste)	Diterpeni (uglavnom kiseline labdanskog tipa)
Clusia	Kuba i Venecuela	<i>Clusia</i> spp	Poliprenilirani bezofenoni
Pacifički	Okinawa, Tajvan, Indonezija	<i>Macaranga tanarius</i>	C-prenil-flavanoni

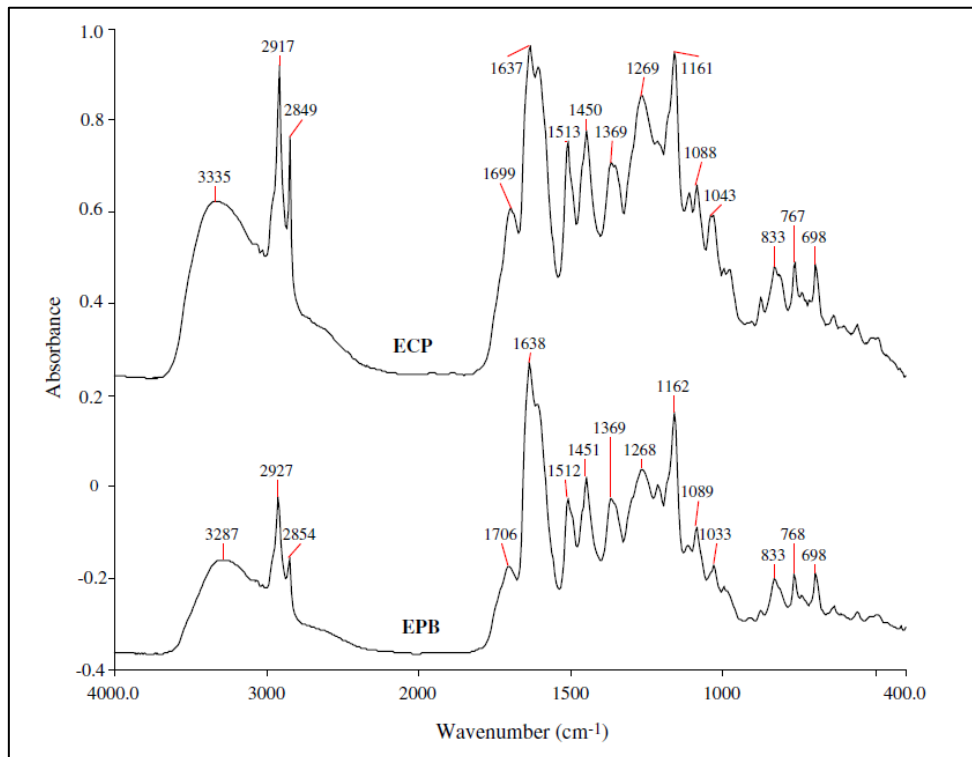
Izvor: Bogdanov S. (2016).

2.4. Fizikalno-kemijska i organoleptička svojstva propolisa

Boja propolisa varira od žute do tamno smeđe/crne, crvene ili zelene, što ovisi o botaničkom i zemljopisnom podrijetlu, kao i sezoni skupljanja (Bogdanov i Bankova, 2012). Propolis ima intenzivan, ugodan i smolasto - aromatičan miris koji se mijenja ovisno o prisutnim smolama, što vrijedi i za okus, koji je oporo-gorak i jedač (nadražujući). Gustoća propolisa je od 1,11 do 1,14 g/cm³ (Bogdanov, 2016), a njegova konzistencija ovisi o temperaturnim uvjetima; na niskim je temperaturama tvrd i krhak, a prema 30 °C postaje rastezljiv te se lako oblikuje. Na temperaturama višim od 30 °C postaje viskozan i ljepljiv, a topi se na 65-70 °C (Kezić i sur., 2013).

2.5. Istraživanja kemijskog sastava propolisa

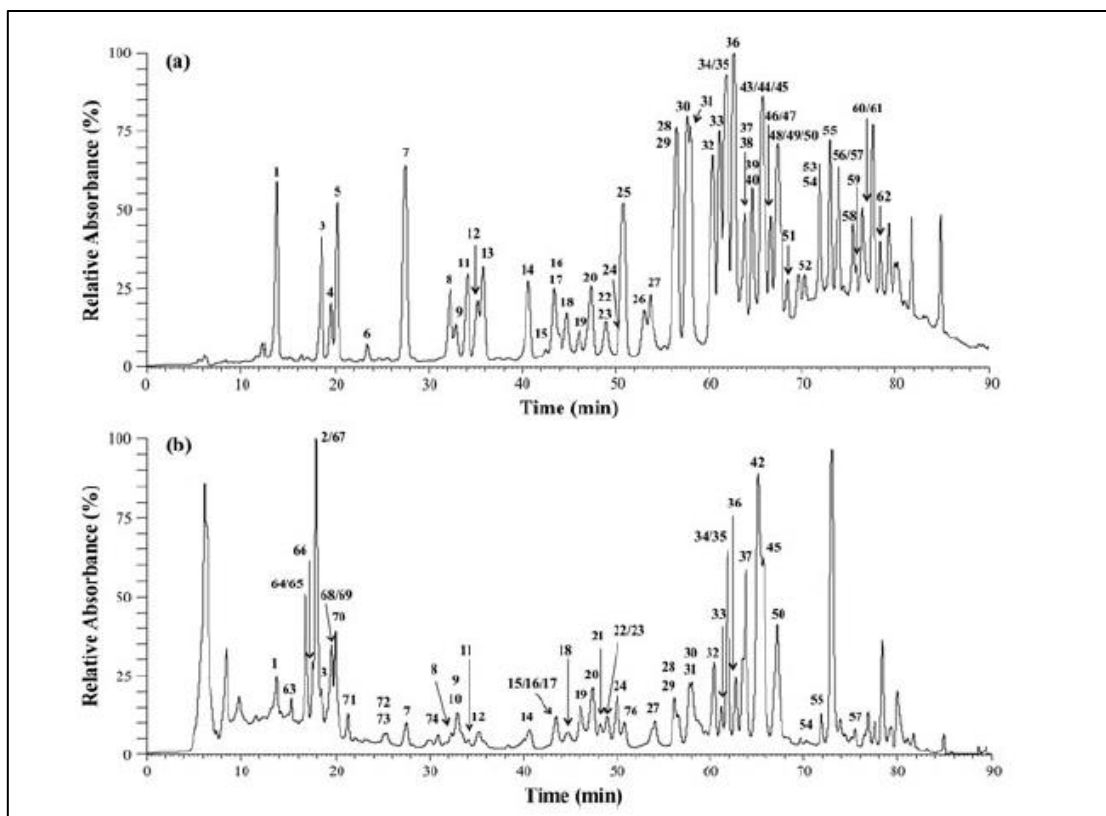
Silici i Kutluca (2005) istraživali su kemijski sastav i antibakterijsku aktivnost propolisa koji je skupljen od strane tri različite pasmine medonosne pčele (*A. mellifera*), a u ispitivanim uzorcima je identificirano više od 300 sastavnica. Najznačajnije su sastavnice bili flavonoidi, aromatske kiseline, diterpenske kiseline i fenolni spojevi koji se smatraju odgovornima za biološku aktivnost ispitivanih uzoraka propolisa. Tipičan spektar propolisa snimljen spektroskopijom u infracrvenom dijelu spektra s Fourierovom transformacijom i prigušenom totalnom refleksijom (engl. *Fourier transform infrared spectroscopy-attenuated total reflectance*, FTIR-ATR) prvi su prikazali Wu i sur. (2008), koji su proveli istraživanje na alkoholnim ekstraktima kineskog propolisa (engl. *extract of Chinese propolis*, ECP) i ekstraktima pupoljka topole (engl. *extract of poplar buds*, EPB). Rezultati su pokazali malu razliku u sastavu između ECP i EPB uzoraka. Kako je prikazano na grafikonu 1, u spektralnom području od 3000 cm^{-1} do 2800 cm^{-1} oba spektra prikazuju dvije intenzivne apsorpcijske vrpce koje pripadaju isteznim vibracijama CH_2 skupine zasićenih ugljikovodika. Budući da su apsorpcijske vrpce ECP-a bile intenzivnije od one EPB-a, autori su zaključili kako postoji veća količina dugolančanih alkilnih spojeva u ECP uzorcima te kako razliku uzrokuje atom ugljika alkilnog lanca s različitim rasporedom (umjesto spojeva flavonoida koji su općenito prepoznati kao bioaktivne tvari propolisa). Također, uočeno je kako postoje velike količine dugolančanih alkilnih spojeva u ECP i EPB, uključujući dugolančane alkane (oko 2920 i 2850 cm^{-1}), dugolančane alkil estere (1706 i 1161 cm^{-1}) i dugolančane alkil alkohole (1088 i 1043 cm^{-1}).



Grafikon 1. FT-IR spektar ekstrakta kineskog propolisa i ekstrakta pupoljka topole
izvor: Wu i sur., 2008.

U većini IR spektroskopskih istraživanja propolisa, analiza je usmjerena na etanolni ekstrakt propolisa (Do Nascimento i sur., 2016; Nunes Oliveira i sur., 2016; Franca i sur., 2014; Dewi Yuliana i sur., 2013; Catalin i sur., 2011; Wu i sur., 2008), dok sirovi propolis iz košnica koji služi kao baza za pripremu proizvoda od propolisa (kao što je najčešće korištena etanolna tinktura propolisa) još nije istražen.

Miguel i sur. (2010) također su uočili raznolikost sastava propolisa s područja Portugala koja je promatrana kroz razlike u fizikalno-kemijskim parametrima (boja i konzistencija) i razlike u ukupnom fenolnom sadržaju. Rezultati spomenutog istraživanja bili su u skladu s botaničkom raznolikošću istraživanih područja i potragom pčela za alternativnim izvorima smole u regijama u kojima topola nije bila prisutna. Nadalje, Falcao i sur. (2013) su istraživali propolis iz različitih portugalskih kontinentalnih područja i otoka te su utvrdili postojanje različitih tipova propolisa temeljem fizikalno-kemijskih parametara (neobjavljeni podaci). Temeljem dobivenih rezultata identificirali su tip propolisa iz umjerene klimatske zone koji je sastavom odgovarao tipičnom propolisu skupljenom s topole (temeljem glavnih fenolnih komponenata) i neuobičajeni tip propolisa iz umjerene zone, koji je pored tipičnih flavonoida sadržavao i značajne količine neuobičajenih flavonoida glikozida. Više od 85% uzoraka portugalskog propolisa u ovom istraživanju su identificirani kao tip propolisa iz umjerene klimatske zone s uobičajenim fenolnim profilom. Ova je grupa uključivala sve uzorke sa središnje obale i Azora, kao i većinu uzoraka sa sjevera te neke sa središnje i južne Madeire. Šest od 40 uzoraka propolisa imalo je određeni fenolni profil koji se razlikuje od onog karakterističnog za propolis iz umjerene klimatske zone. Kao što je prikazano na grafikonu 2, njihov kromatogram je karakteriziran skupinom pikova koji su povezani s flavonoidnim glikozidima. Štoviše, ovih šest uzoraka propolisa sadržavalo je još četiri fenolna spoja koji nisu otkriveni u uobičajenom uzorku propolisa: elaginska kiselina (2), luteolin (10), dimetoksilirani flavonol (21) i dihidroksi-dimetoksiflavon (42).



Grafikon 2. Kromatogram uzorka uobičajenog propolisa tipa topola (a) i neuobičajenog tipa propolisa iz umjerene klimatske zone (b) snimljen na 280nm

izvor: Falcao i sur., 2013

Daljnjom analizom metodom vezanog sustava tekućinske kromatografije–spektrometrije masa (engl. *liquid chromatography–mass spectrometry*, LC-MS) analizirani su podatci svih uzoraka glikozid tipa propolisa, a rezultati su indicirali postojanje jednog ili više biljnih izvora smola, uz vrste *Populus*. Autori su zaključili kako je zbog raznolikosti izvora biljnih i balzamskih smola dostupnih pčelama teško odrediti točno botaničko podrijetlo flavonoidnih glikozida koji se nalaze u uzorcima propolisa.

Do Nascimento i Da Silva (2016) navode kako su u brazilskom crvenom propolisu metodom visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (engl. *ultra performance liquid chromatography*, UPLC) pronađeni sljedeći spojevi: elemicin, isoelemicin, metil izoeugenol, metil eugenol, formononetin, biohanin, A kvercetin i vestitol, koji omogućuju razlikovanje od drugih vrsta brazilskog propolisa. Biološke aktivnosti koje proizlaze iz očuvanja atlantskog dijela prašume na području Brazila očituju se u karakterističnom kemijskom sastavu crvenog propolisa.

Zbog razlika u sastavu teško je odrediti jasne kriterije kakvoće propolisa. Bankova i sur. su 2002 godine započeli istraživanja usmjerena na razvoj postupaka za standardizaciju i kontrolu kakvoće propolisa iz Bugarske, Italije i Švicarske. Istražen je kemijski sastav tri uzorka iz Bugarske, tri iz Italije i četiri iz Švicarske pomoću vezanog sustava plinske kromatografije - spektrometrije masa (engl. *gas chromatography–mass spectrometry*, GC-MS) analize te je identificirano više od 80 pojedinačnih spojeva. Većina uzoraka pokazala je

sastavom tipičan uzorak propolisa topole: utvrđen je pinocembrin, pinobankin i njegov 3-O-acetat, krizin, galangin, prenil estere kafeinske kiseline, a odnos između glavnih spojeva odgovarao je onom kojeg izlučuju pupoljci *P. nigra*. Međutim, dva uzorka (švicarskog i talijanskog podrijetla) su se bitno razlikovali od drugih. Uzorak švicarskog podrijetla imao je relativno nisku koncentraciju fenola, a neki spojevi (pinobankin i prenil esteri kafeinske kiseline) tipični za *P. nigra* bili su u potpunosti odsutni. Umjesto toga, koncentracije benzil p-kumarata i benzil ferulata bile su neuobičajeno visoke (iznad 5 %). Uzorak švicarskog propolisa skupljen je na 700 m nadmorske visine, sa strmim planinskim padinama, a autori navode kako je u tom području bio relativno velik broj mladih stabala *P. tremula* i relativno malo *P. nigra* te su tome pripisali razliku u kemijskom sastavu propolisa. Drugi uzorak s područja Italije (Sicilija) sadržavao je vrlo male količine fenolnih tvari (manje od 1,3%) dok su njegove glavne komponente bile diterpenske kiseline, koje su ostale neidentificirane zbog nedostatka autentičnih uzoraka i spektara odgovarajućih spojeva.

Niz istraživanja kakvoće propolisa u kojima su primijenjeni različiti analitički alati (Bankova i Marucci, 2000; Wu i sur., 2008; Catalin Mot i sur., 2011), rezultirali su recentnom publikacijom (Bankova i sur., 2016) kojom su analitičke metode za ispitivanje kakvoće propolisa standardizirane.

2.6. Analitičke metode za određivanja kemijskog sastava propolisa

Analitičke metode za određivanje kemijskog sastava propolisa uključuju konvencionalne tehnike kao što su UV-VIS, TLC, GC-MS i HPLC, koje su vrlo korisne u identifikaciji i kvantifikaciji različitih kemijskih spojeva u propolisu, no i dalje je najčešće korišten vezani sustav tekućinske kromatografije–spektrometrije (LC-MS) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC), koji su olakšali fenolnu karakterizaciju propolisa iz svih krajeva svijeta (Falcao i sur., 2013; Bankova i sur., 2016). Ipak, navedene metode karakteriziraju i određeni nedostaci.

- Ultraljubičasta i vidljiva spektrofotometrija (UV-VIS)

Ultraljubičasto vidljiva spektroskopija ili ultraljubičasto vidljiva spektrofotometrija (UV-Vis ili UV / Vis) odnosi se na apsorpcijsku spektroskopiju u ultraljubičastom vidljivom spektralnom području. To znači da koristi svjetlost u vidljivim i susjednim (gotovo UV i blizu infracrvenim (engl. *near infrared*, NIR) rasponima. UV / Vis spektrofotometar se koristi za kvantitativno određivanje koncentracija adsorbensa u otopinama prijelaznih metala i visoko konjugiranih organskih spojeva (Verma, 2012).

Do apsorpcije dolazi uslijed elektronskih prijelaza u molekulama. Koristi se za kvantitativno određivanje prijelaznih metala i organskih komponenti u otopini, a boje raznih otopina ovise o prisutnosti raznih drugih vrsta kao što su određeni anioni ili ligandi (Ernješ, 2017).

- Tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti (TLC)

Tankoslojna kromatografija (engl. *thin layer chromatography*, TLC) široko je korištena laboratorijska tehnika i slična je papirnoj kromatografiji, međutim, umjesto korištenja papira kao stacionarne faze, koristi se tanki sloj adsorbensa poput glinice, silikagela ili celuloze te se zbog toga ubrzava odvajanje što joj je najveća prednost u odnosu na ostale vrste kromatografije (Kumar i sur., 2012).

Odjeljivanja TLC-om temelje se na adsorpciji, razdjeljenju, ionskoj izmjeni, isključenju veličinom ili kombinaciji ovih mehanizama. Nepokretna faza je tanki sloj fino dispergiranih čestica nanesen na staklenu ili plastičnu ploču, a pokretna se faza kreće kapilarnim silama ili silom gravitacije uzduž sloja (Kljenak, 2017).

- Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

U kromatografskim metodama, kao što je plinska ili tekuća kromatografija zajedno s detektorima masene spektrometrije, cilj je identificirati spojeve te usporediti njihove koncentracije unutar uzoraka (Johnsen i sur., 2017), a pogodna je za analizu spojeva koje je moguće prevesti u plinovito stanje bez da se raspadnu pri temperaturama od nekoliko stotina °C.

Temelji se na razdvajanju analita između plinovite mobilne faze i tekuće faze imobilizirane na inertnom nosaču stjenki kapilarne cjevčice (kapilarne kolone) (Kljenak, 2017). Oprema koja se koristi za plinsku kromatografiju sastoji se od injekcijskog ulaza na jednom kraju metalne kolone s materijalima supstrata, i detektora na drugom kraju kolone. Plin nosač (mobilna faza) pokreće uzorak niz stupac. Plin koji ne reagira s uzorkom ili stupom neophodan je za pouzdane rezultate. Iz tog razloga, nosivi plinovi obično su argon, helij, vodik, dušik ili vodik. Mnogi analitičari koriste helij jer ne reagira dok je vodik obično dobar transportni plin, ali može reagirati i pretvoriti uzorak u drugu tvar (Douglas, 2010). Sastojci uzorka se zbog različitih fizikalno kemijskih svojstava razdvajaju na kromatografskoj koloni, te u različito vrijeme dolaze u maseni spektar (Kljenak, 2017).

- Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti najrazvijeniji je oblik kromatografije. To je analitička tehnika za odvajanje, prepoznavanje i kvantificiranje komponenata u smjesi. U kolonskoj kromatografiji postoje dvije faze – mobilna i stacionarna. Mobilna faza je otapalo koje pod utjecajem gravitacije kaplje kroz kolonu napunjenu adsorbensom dok je stacionarna faza obično granulirani materijal načinjen od krutih čestica kao što su silicijev dioksid ili polimeri (Koester, 2016).

Komponente smjese međusobno su odvojene zbog različitih stupnjeva interakcije s apsorbentnim česticama. Spojevi s malim afinitetom za stacionarnu fazu i dobre topljivosti u mobilnoj fazi brzo se ispiru iz kolone, a spojevi koji se dobro vežu za stacionarnu fazu i slabo su topljivi u mobilnoj kreću se mnogo sporije kroz kolonu (Kljenak, 2017). To uzrokuje različite brzine elucije za različite komponente i dovodi do odvajanja komponenti dok istječu iz kolone. Na detektoru su vidljive u obliku pikova (engl. *peak*) iz kojih se mogu posljedično odrediti kvantitativna i/ili kvalitativna svojstva detektirane tvari (Kljenak, 2017). U usporedbi

s kolonskom kromatografijom, HPLC je vrlo automatiziran i izuzetno osjetljiv (Koester, 2016).

Uz navedene analitičke metode, u posljednje se vrijeme za kemijsku karakterizaciju etanolnog ekstrakta propolisa sve učestalije primjenjuje FTIR-ATR spektroskopija, no njena standardizacija za analizu propolisa još nije provedena.

2.7. Infracrvena (IR) spektroskopija

Spektroskopija je znanost koja proučava interakciju elektromagnetskog zračenja i materije te daje informacije o građi i sastavu tvari. Infracrvena spektroskopija kao medij proučavanja koristi infracrveno zračenje koje se u području valnih duljina nalazi od 0.8 do 1000 μm , a gotovo svaki spoj koji ima kovalentne veze apsorbira različite frekvencije elektromagnetskog zračenja u infracrvenom području elektromagnetskog spektra (Pavia i sur., 2009).

Elektromagnetsko zračenje je zračenje energije koja ima osobine i čestice i vala, odnosno zračenje "čestice zračenja" nazvane fotonom, koja putuje brzinom svjetlosti. Zračenje fotona je karakterizirano frekvencijom, valnom duljinom i amplitudom (Skoog i Leary, 1992). Spomenuta frekvencija je druga često korištena veličina za obilježavanje valnog gibanja. Definirana je kao broj titranja koje oscilirajući električni vektor izvede u jedinici vremena. No, valni broj ($\tilde{\nu}$) predstavlja veličinu koja po značenju nadmašuje valnu duljinu i frekvenciju. Valni broj predstavlja recipročnu vrijednost valne duljine ($1/\lambda$) izraženu u recipročnim centimetrima (cm^{-1}). Najvažniji argument za primjenu valnog broja, kao mjerne veličine, jest njegova proporcionalnost s frekvencijom elektromagnetskog polja. Prema valnom broju, infracrveni dio spektra pokriva područje od 12500 do 10 cm^{-1} (područje bliskog, srednjeg i dalekog IR zračenja) (Günzler i Gremlich, 2006).

IR spektroskopija spada u domenu molekulske, tj. vibracijske spektroskopije. Naime, sve molekule vibriraju, a molekulske su vibracije, za razliku od vibracija makroskopskih tijela, kvantizirane (Svečnjak, 2015). Molekula može vibrirati točno određenim amplitudama, koje odgovaraju vibracijskim energetskim razinama. Apsorpcijom infracrvenog zračenja molekulske se vibracije pobuđuju te molekule počinju jače vibrirati. Ako vibracija molekule uzrokuje promjenu dipolnog momenta (DM) molekule, vibracija će se sprežati s elektromagnetskim zračenjem i doći će do emisije ili apsorpcije IR zračenja te će takva vibracija biti aktivna (vidljiva) u infracrvenom spektru. Mnoge funkcijske skupine pokazuju karakteristične vibracije, čije se apsorpcijske vrpce pojavljuju u određenim područjima IR spektra iz kojih je detaljnijim razmatranjem intenziteta i položaja moguća asignacija prepoznate strukturne skupine (Günzler i Gremlich, 2006).

2.7.1. FTIR-ATR- spektroskopija

U usporedbi sa spektroskopskim metodama, kromatografske su metode destruktivne iz aspekta pripreme i analize uzoraka, a budući da mogu otkriti samo podskup kemijskih komponenti u složenim sustavima, korištenje kromatografskih metoda je neučinkovito za identifikaciju sličnih prirodnih proizvoda. Stoga se kao nedestruktivna, jednostavna, i brza metodom s dobrom ponovljivosti pokazala FTIR-ATR tehnika analize uzoraka propolisa, budući

da može učinkovito pratiti cjelokupan biokemijski sastav biološkog materijala. FTIR spektroskopija se koristi za prepoznavanje kemijskih spojeva i predstavlja važnu metodu u Farmakopeji mnogih zemalja (Wu i sur., 2008).

Najsuvremeniji infracrveni spektrometri (spektrofotometri) djeluju tako da dizajn optičkog puta daje uzorak zvan interferogram. Interferogram je kompleksni signal, ali njegov valni uzorak sadrži sve frekvencije koje čine infracrveni spektar. Interferogram je u osnovi zaplet intenziteta u odnosu na vrijeme (spektar vremenskih domena) koji prolazi kroz uzorak i dolazi do detektora, te se uz pomoć Fourierovih transformacija pretvara iz vremenske domene u IR-spektar frekvencijske domene (jačina apsorpcije kao funkcija frekvencije). Matematička operacija poznata kao Fourierova transformacija (FT) može odvojiti pojedine apsorpcijske frekvencije od interferograma, stvarajući spektar praktički identičan onom dobivenom s disperzivnim spektrometrom.

Prednost FTIR instrumenta je da stječe interferogram u manje od sekunde. Tako je moguće prikupiti desetke interferograma istog uzorka i akumulirati ih u memoriji računala. Kada se izvede Fourierova transformacija na zbroj akumuliranih interferograma, može se dobiti spektar s boljim omjerom signala i šuma. Stoga FTIR instrument može imati veću brzinu i veću osjetljivost od disperzijskog instrumenta (Pavia i sur., 2009).

Razvojem spektroskopskih tehnika i suvremenom kemometrijom, FTIR je primijenjen u složenim sustavima kao što su i tradicionalni kineski lijekovi, a područja primjene FTIR spektroskopije sve su šira (Wu i sur., 2008).

3. Materijali i metode

3.1. Uzorkovanje

Uzorkovanje propolisa je provedeno tijekom 2018. godine u aktivnom dijelu pčelarske sezone na dva stacionirana pčelinjaka: Pčelinjak Agronomskog fakulteta (AGR) (slika 3) i pokušalište ban Josip Jelačić (PRO) (lovište III/29 Prolom) u Buzeti kraj Gline (slika 4). Postupak uzorkovanja provodio se svakih 15 dana na odabranim pokusnim pčelinjim zajednicama na obje lokacije u razdoblju od 18. travnja do 9. kolovoza 2018. godine, pri čemu je ukupno prikupljeno 180 uzoraka.



Slika 3. Pčelinjak u Zagrebu
izvor: S. Prđun, 2018



Slika 4. Pčelinjak u lovištu III/29 Prolom
izvor: S. Prđun, 2018

3.2. Odabir pokusnih pčelinjih zajednica

Određivanjem jačine pčelinjih zajednica prema *Liebefeld* metodi izdvojeno je 5 zajednica na svakom pčelinjaku (lokacija AGR i PRO) koje su odgovarale potrebama ovog istraživanja. Zajednice sive pčele (*Apis mellifera carnica* Pollmann 1879) bile su smještene u Langstroth-Roothove košnice (LR). Na svakoj odabranoj zajednici u plodišnom nastavku su bila obilježena dva plodišna (P) (slika 5) i dva medišna okvira (M) (slika 6) s kojih su prikupljani uzorci propolisa.



Slika 5. Plodišni okviri (P)



Slika 6. Medišni okviri (M)

3.3. Metoda prikupljanja propolisa

Uzorci propolisa su prikupljeni s bočnih spojeva odabranih plodišnih i medišnih okvira (slika 7) uz pomoć pčelarskog dljeteta (slika 8). Nakon svakog uzorka dljeto je bilo očišćeno etilnim alkoholom (96 %). Prikupljeni uzorci pohranjeni su u plastične bočice i čuvani na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi do daljnje analize.



Slika 7. Mjesto prikupljanja propolisa



Slika 8. Uzimanje uzorka

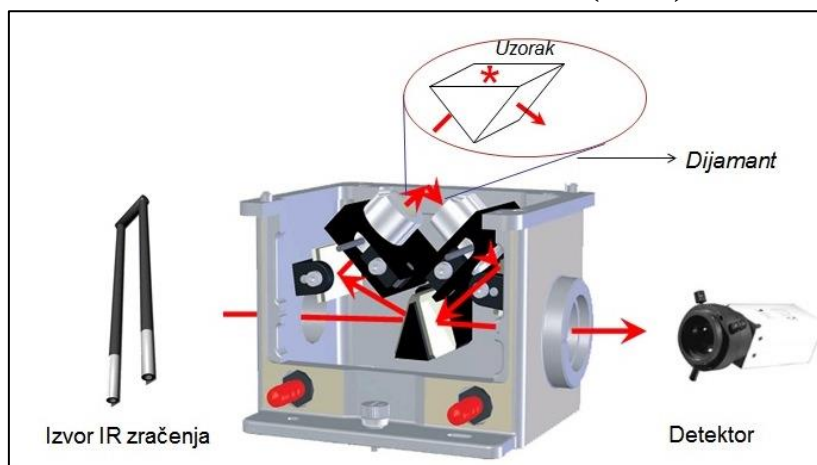
3.4. Analiza uzoraka propolisa metodom FTIR-ATR spektroskopije

Uzorci propolisa analizirani su metodom FTIR-ATR spektroskopije; spektroskopije u srednjem infracrvenom dijelu spektra (spektralno područje: $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) s Fourierovom transformacijom (FT) i ATR (engl. *attenuated total reflectance*; prigušena totalna refleksija) tehnikom snimanja (slika 9). Infracrveni spektri prikupljenih uzoraka propolisa snimljeni su u izvornom stanju pomoću infracrvenog spektrometra Cary 660 (Agilent Technologies) s DTGS (deuterirani triglicin sulfat) detektorom i CsI (cezijev jodid) optikom (slika 10), spektralnog raspona od $5000\text{ do }200\text{ cm}^{-1}$. Za snimanje spektara korištena je tehnika jednorefleksijske prigušene totalne refleksije (ATR), a u tu svrhu upotrijebljen je Golden Gate ATR instrumentalni dodatak (Specac) s dijamantom kao internim refleksijskim elementom i ZnSe (cinkov selenid) optičkim komponentama (slika 11). ATR tehnika snimanja ili prigušena unutarnja refleksijska spektroskopija je tehnika mjerenja bez razaranja uzorka koja daje IR spektar gornje površine tvari (dubina prodora IR zračenja u uzorak = $0,5\text{ }\mu\text{m}$) u kontaktu s internim refleksijskim elementom. Uzorak propolisa je prije snimanja spektra postavljen na dijamant ATR ploče te pritisnut dodatnim instrumentalnim dodatkom sa safirnim kristalom (slika 12) kako bi se omogućilo formiranje tankog sloja uzorka, tj. analiza uniformnih slojeva svih ispitivanih uzoraka. Apsorpcijski spektri uzoraka propolisa snimljeni su na sobnoj temperaturi ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) pri spektralnoj rezoluciji od 4 cm^{-1} . Svaki spektar snimljen je kao razlika spektra uzorka i ATR elementa bez uzorka. Za svaki spektar prikupljeno je 50 snimaka. Nakon analize svakog uzorka ATR kristal temeljito je očišćen etilnim alkoholom

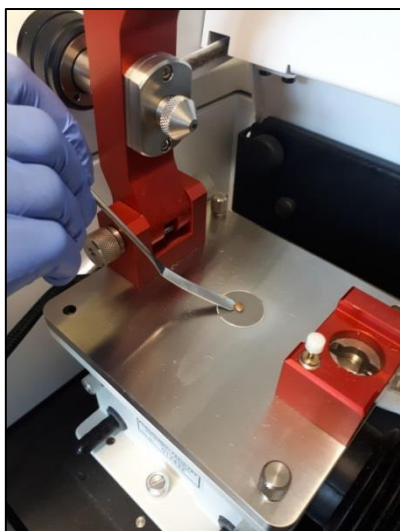
(96%) i osušen mekim papirnatim materijalom. Kako bi se isključili nepotrebni (bezsignalni i/ili šumni) dijelovi spektra, samo je spektralni raspon između 3800 i 600 cm^{-1} uzet u obzir za daljnju analizu i obradu podataka. IR spektri analiziranih uzoraka propolisa pohranjeni su u spektrometersko računalo u BSC formatu, te konvertirani u SPC format pomoću softverskog paketa Resolutions Pro (Agilent Technologies) u svrhu daljnje obrade podataka.



Slika 9. FTIR spektrometar s računalom za pohranu i obradu spektralnih podataka (lijevo) i ATR instrum entalnim dodatkom (desno)



Slika 10. Shematski prikaz snimanja IR spektra uzoraka propolisa metodom FTIR spektroskopije s ATR tehnikom snimanja
izvor: Svečnjak, 2015.



Slika 11. Analiza uzoraka propolisa metodom FTIR-AT spektroskopije



Slika 12. Safirni kristal za formiranje tankog sloja uzorka propolisa

3.5. Obrada i analiza spektralnih podataka

Kvalitativna interpretacija IR spektara propolisa provedena je s ciljem kemijske karakterizacije ispitivanih uzoraka propolisa (asignacije apsorpcijskih vrpca odgovarajućim funkcionalnih skupina molekula u uzorku) pomoću softverskog paketa za kvalitativnu analizu spektralnih podataka Spekwin32 (Spekwin32: optical spectroscopy software, version 1.72.0.). Nakon kvalitativne obrade podataka i identifikacije signala prisutnih (asignacije apsorpcijskih vrpca) u IR spektrima propolisa, spektri su podvrgnuti kemometrijskoj obradi koja je provedena pomoću programskog paketa za analizu, manipulaciju i grafički prikaz spektralnih podataka Origin 8.1. (OriginLab, version 8.1.).

4. Rezultati i rasprava

4.2. Rezultati analize propolisa metodom FTIR-ATR spektroskopije

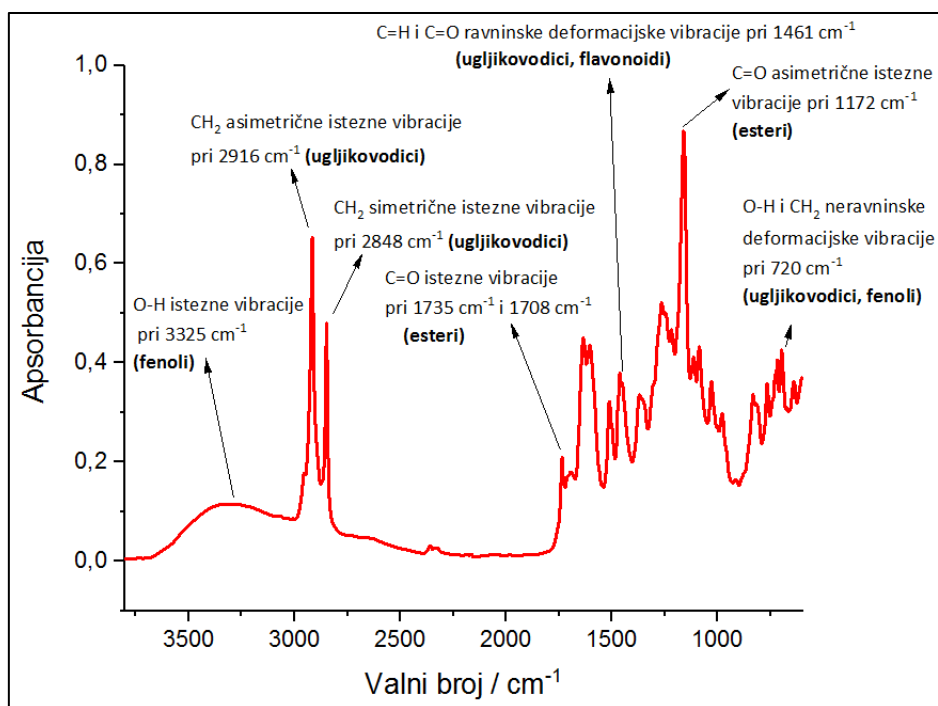
4.2.1. Karakterističan FTIR-ATR spektar sirovog propolisa

Rezultati prikazani na grafikonu 3. i 4. prikazuju karakteristični FTIR-ATR spektar sirovog propolisa i pripadajuće temeljne molekulske vibracije, koji je dobiven kao srednji spektar 90 spektara propolisa s AGR lokacije. Složenost IR spektra propolisa i pripadajućih apsorpcijskih vrpca proizlazi iz složenog sastava u kojem dominiraju tvari iz balzamske skupine spojeva (fenoli) (Socrates, 2001). S obzirom na dominantne apsorpcijske vrpce uočene u spektru, može se potvrditi kako balzami u kemijskom sastavu propolisa zauzimaju veći udio u odnosu na nebalzamske komponente. U balzame spadaju fenoli, esteri, flavonoidi, flavanoni, dihidroflavanoni, flavoni, flavanoli dok se nebalzamski dio sastoji od pčelinjeg voska, aminokiselina, esencijalnih ulja, proteina i drugih spojeva.

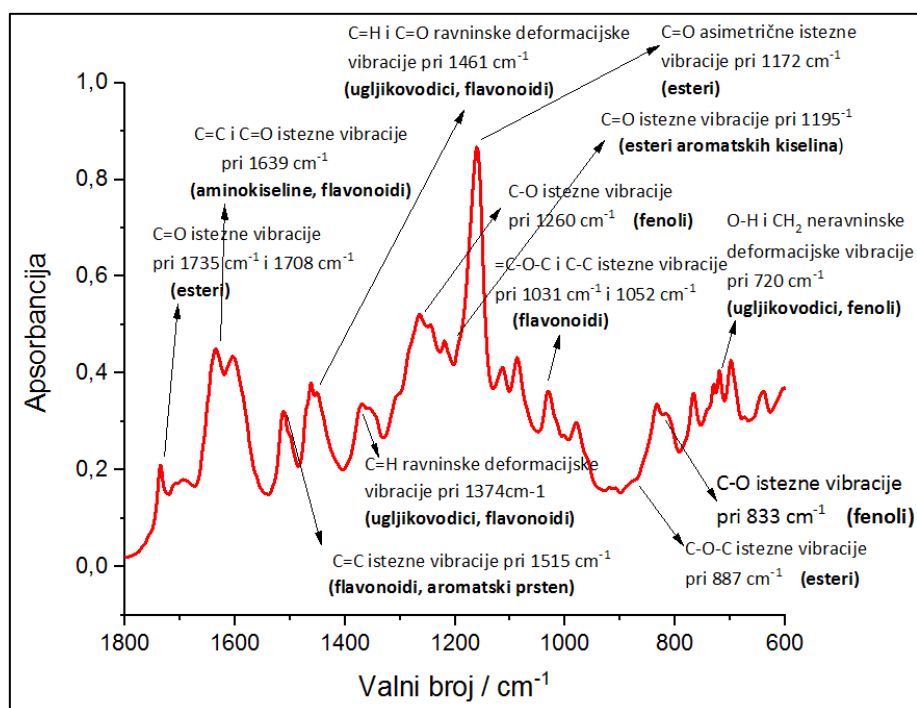
U spektrima analiziranih uzoraka propolisa široka jaka vrpca koja se nalazi na 3350 cm^{-1} javlja se zbog O-H isteznih vibracija fenolne skupine. Interakcija ravninskih deformacija O-H skupine i isteznih vibracija C-O veza koje su uočene u spektralnom rasponu između 1405 i 1220 cm^{-1} pokazuju spektralne značajke povezane s fenolima (s maksimalnom apsorbancijom na 1374 cm^{-1}), a mogu se primijetiti i u obliku složenog niza vibracija slabijeg intenziteta između 1260 i 1180 cm^{-1} . C-O istezne vibracije fenola također su vidljive na 833 cm^{-1} , a pri 720 cm^{-1} uočena je jaka izvan-ravninska deformacijska vibracija O-H skupine.

Vibracija srednjeg intenziteta apsorpcije na 1515 cm^{-1} dodijeljena je flavonoidima i isteznim C=C vibracijama aromatskog prstena (Wu i sur., 2008), dok se istezne deformacije C-H veza i aromatično istezanje na 1461 cm^{-1} mogu pripisati flavonoidima (vibracije CH_3 i CH_2 ugljikovodika se preklapaju).

Na području “otiska prsta” (područje od 1800 do 800 cm^{-1}), široka vrpca s maksimumom apsorpcije pri 1172 cm^{-1} odgovara C-O asimetričnom istezanju vibracija estera koje su povezane s alifatskim kiselinama. Zasićeni alifatski esteri tipično apsorbiraju na 1750 - 1725 cm^{-1} (Socrates, 2001) te se može zaključiti kako je apsorpcijska vrpca koja se javlja na 1735 cm^{-1} posljedica istezne vibracije karbonilne skupine (C=O) esterske veze.



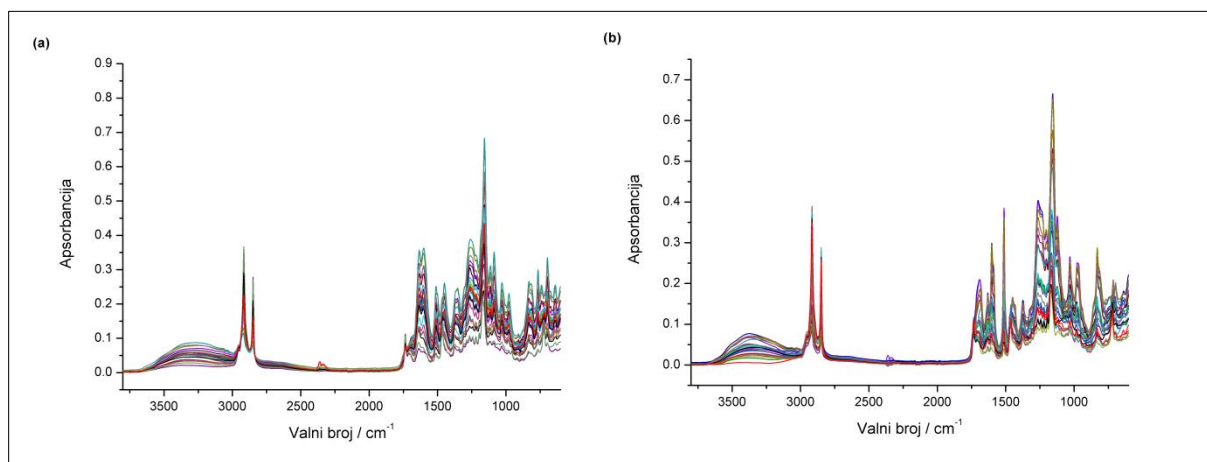
Grafikon 3. Karakterističan infracrveni (IR) spektar propolisa s općom asignacijom najznačajnijih apsorpcijskih vrpca (cijelo spektralno područje 4000-400 cm^{-1})



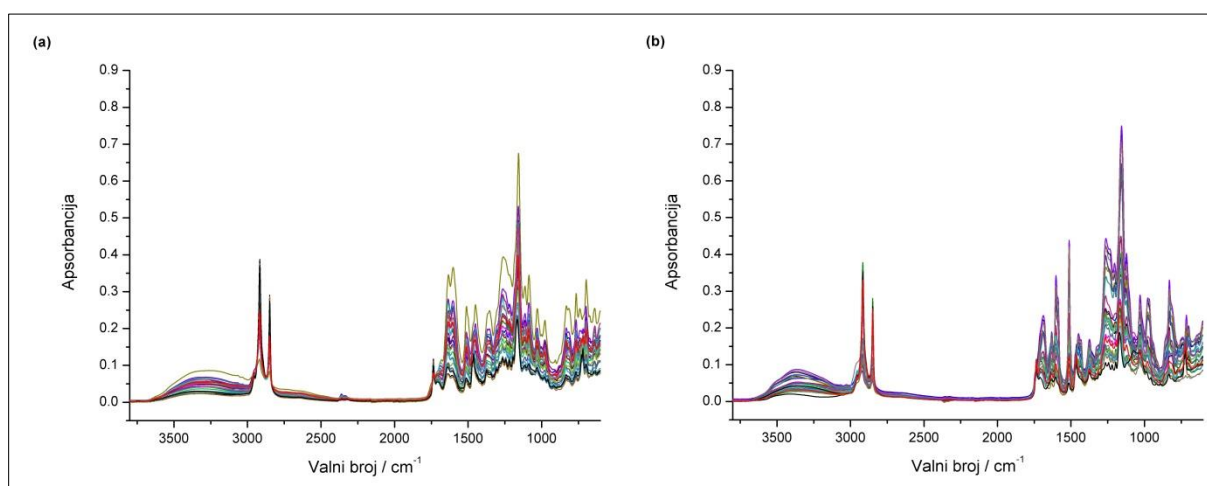
Grafikon 4. Karakterističan infracrveni (IR) spektar propolisa i asignacija pripadajućih apsorpcijskih vrpca u području "otiska prsta" (1800-600 cm^{-1})

4.2.2. Rezultati analize propolisa unesenog na različite pozicije u košnici

Kako bi se utvrdilo postoje li razlike u kemijskom sastavu propolisa unesenog između plodišnih (P) i medišnih (M) okvira, analizirani su srednji spektri uzoraka propolisa prikupljeni tijekom deset uzorkovanja u razdoblju od travnja do kolovoza 2018. godine. Samo za prezentaciju, na grafikonu 5. i 6., prikazane su spektralne varijacije uočene u nasumično odabranim P i M uzorcima propolisa s obje pokusne lokacije ($n=25$ / lokaciji). Iz grafikona 5. vidljive su spektralne varijacije sirovog propolisa unesenog između P okvira na AGR lokaciji (5a) i na PRO lokaciji (5b), a na grafikon 6. prikazane su spektralne varijacije sirovog propolisa unesenog između M okvira na AGR (6a) i PRO (6b) lokaciji.



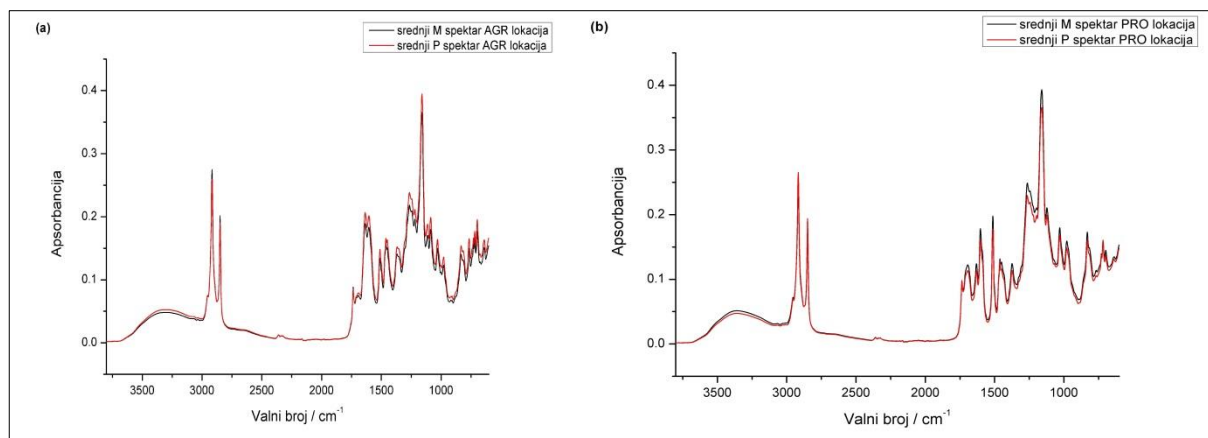
Grafikon 5. Spektralne varijacije nasumično odabranih uzoraka propolisa unesenog između P okvira ($n=25$) na AGR (a) i na PRO (b)



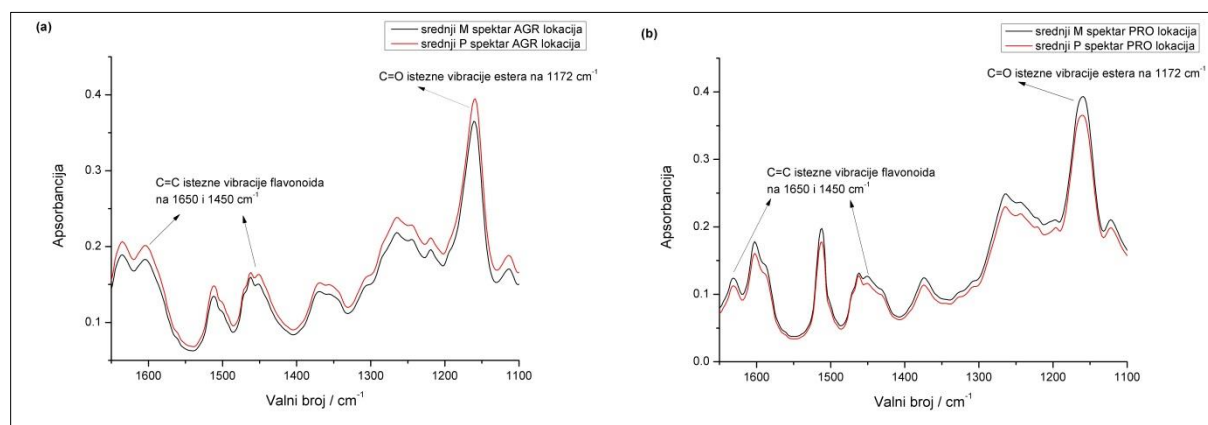
Grafikon 6. Spektralne varijacije nasumično odabranih uzoraka propolisa unesenog između M okvira ($n=25$) na AGR (a) i na PRO (b)

Analizirajući srednje spektre P ($n=90$) i M ($n=90$) uzoraka propolisa s AGR i PRO pokusnih lokacija (grafikon 7), uočene su neznatne razlike u kemijskom sastavu propolisa prikupljenog između plodišnih i medišnih okvira. Kako je vidljivo iz grafikona 8., razlike se

očituju u većem udjelu estera u P uzorcima propolisa s AGR lokacije koje su najistaknutije u području “otiska prsta” između 1300 i 1100 cm^{-1} (grafikon 8a) (istezne vibracije C=O veza smještenih na 1172 cm^{-1} karakteristične su za estere) i većem udjelu flavonida. Suprotno navedenim zapažanjima na AGR lokaciji, u uzorcima prikupljenim s PRO lokacije utvrđen je veći udio estera (vidljivo između 1300 i 1100 cm^{-1}), ali i flavonoida, čije se C=C istezne vibracije očituju od 1650 do 1450 cm^{-1} , u M uzorcima, a te spomenute spektralne razlike se također očituju u području “otiska prsta” kako je prikazano na grafikonu 8b.



Grafikon 7. Spektralne razlike između srednjih spektara uzoraka propolisa unesenog između P i M okvira na AGR (a) i PRO (b)



Grafikon 8. Komparativne spektralne karakteristike srednjih spektara uzoraka propolisa unesenog između P i M okvira na AGR lokaciji s najistaknutijim varijacijama u području između 1650 i 1100 cm^{-1} (a) te s PRO lokacije u istom spektralnom području (b)

Iz dobivenih rezultata razvidno je kako radilice ne unose propolis na različita mjesta u košnici u ovisnosti o kemijskom sastavu. Na lokaciji AGR unesen je propolis s neznatno većim udjelom estera između plodišnih okvira, dok je na PRO lokaciji unesen propolis s

većim udjelom estera između medišnih okvira. Dodatno, na PRO lokaciji je uočena razlika u sastavu flavonoida kod propolisa unesenog između plodišnih i medišnih okvira što se može povezati s raznolikijim botaničkim podrijetlom unesenih smolastih i balzamskih tvari, budući da je pčelinjak na toj lokaciji smješten uz rub šume u ruralnom području, dok se pčelinjak na AGR lokaciji nalazi u urbanoj sredini. Također, rezultati pokazuju kako je u uzorcima propolisa skupljenog između M okvira bilo neznatno više flavonoida u odnosu na propolis prikupljen između P okvira.

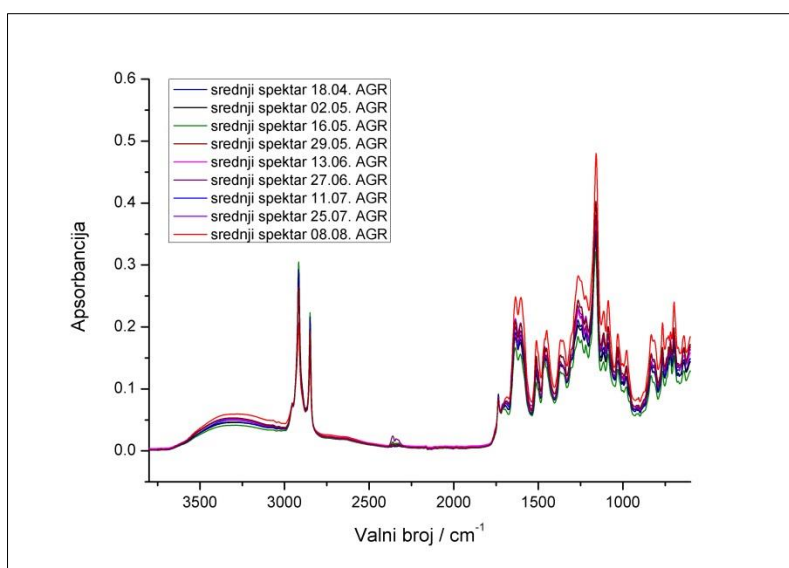
4.2.3. Rezultati analize propolisa prikupljenog tijekom proizvodne sezone (razdoblje travanj-kolovoz)

Kemijski sastav propolisa varira tijekom proizvodne sezone u ovisnosti o dostupnosti biljnih vrsta s kojih radilice skupljaju smolaste i balzamske tvari te je zato jedan od ciljeva ovog rada bio provesti kemijsku karakterizaciju propolisa prateći varijacije sastava tijekom sezone. U tu su svrhu analizirani srednji spektri uzoraka propolisa prikupljenih tijekom sezone unosa propolisa, tj. od travnja do kolovoza 2018. godine. Na AGR i na PRO lokaciji prikupljeno je po 90 uzoraka propolisa (ukupno $n=180$) te je za svako od 18 uzorkovanja (po 10 uzoraka) dobiven srednji spektar.

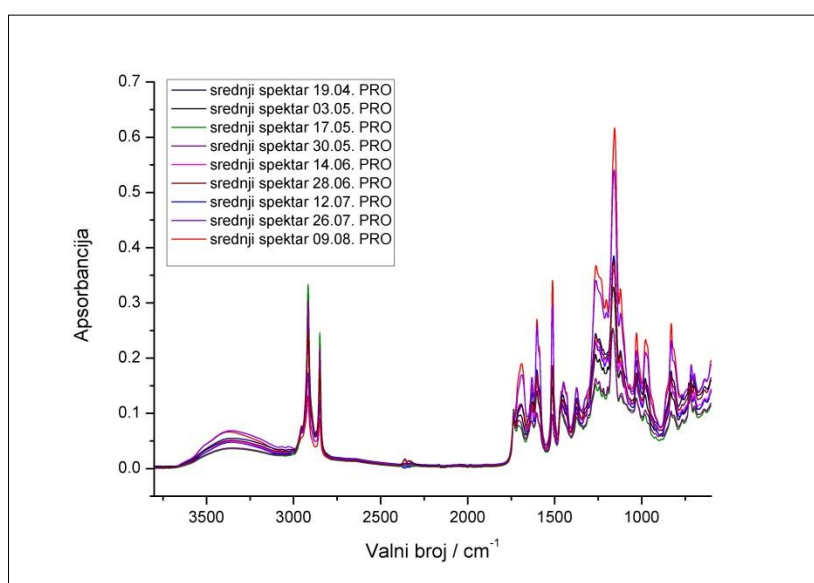
Na području AGR lokacije dominantne biljne vrste su divlji kesten i hrast lužnjak (*Quercus robur* L.), a sporadično se pojavljuju vrba i topola, dok su na PRO lokaciji dominantne vrste joha, topola i hrast kitnjak (*Q. petraea* L.), a sporadično se pojavljuju breza, šljiva i trešnja. Kako između AGR i PRO lokacije postoje razlike u drvenastim biljnim vrstama s kojih su smolaste i balzamske tvari skupljane, dobiveni rezultati potvrdili su postojanje razlika u kemijskom sastavu propolisa između lokacija.

Temeljem srednjih spektara uzoraka propolisa svakog pojedinog mjerenja po lokaciji, uočeno je kako su radilice tijekom sezone unosile smolaste i balzamske tvari različitih biljnih vrsta. Znanstvena literatura s kojom bi se dobiveni rezultati mogli usporediti nije dostupna zbog nedostatka autentičnih uzoraka i identifikacije odgovarajućih spojeva u sirovom propolisu, tj. nije provedena niti kemijska karakterizacija sirovog propolisa u ovisnosti o njegovom botaničkom podrijetlu. Konceptualno slično istraživanje provedeno je na portugalskom kontinentalnom području 2013. godine gdje su Falcao i sur. temeljem LC-MS analize podataka uzoraka glikozid tipa propolisa sugerirali postojanje jednog ili više biljnih izvora smola, uz vrste *Populus*, a autori su zaključili kako je teško odrediti točno botaničko podrijetlo flavonoidnih glikozida koji se nalaze u uzorcima (zbog raznolikosti izvora biljnih i balzamskih smola dostupnih pčelama).

Kako je prikazano na grafikonu 9., na AGR lokaciji može se istaknuti srednji spektar uzoraka propolisa uzorkovanih 8. kolovoza koji se izdvaja u odnosu na srednje spektre drugih mjerenja tijekom pokusnog razdoblja. Naime, uočene su intenzivnije vrpce s maksimumima apsorpcije pri 1735, 1639, 1515, i 1172 cm^{-1} koje se pripisuju balzamskim komponentama (biljne smole i balzami) propolisa. Uzorkovanjem u svibnju (16. svibnja) dobiveni su suprotni rezultati (slabiji intenziteti spomenutih apsorpcijskih vrpce). Ovaj je spektralni efekt uočen i na PRO lokaciji (grafikon 10) te je pozadina ovog efekta detaljnije pojašnjena u nastavku.



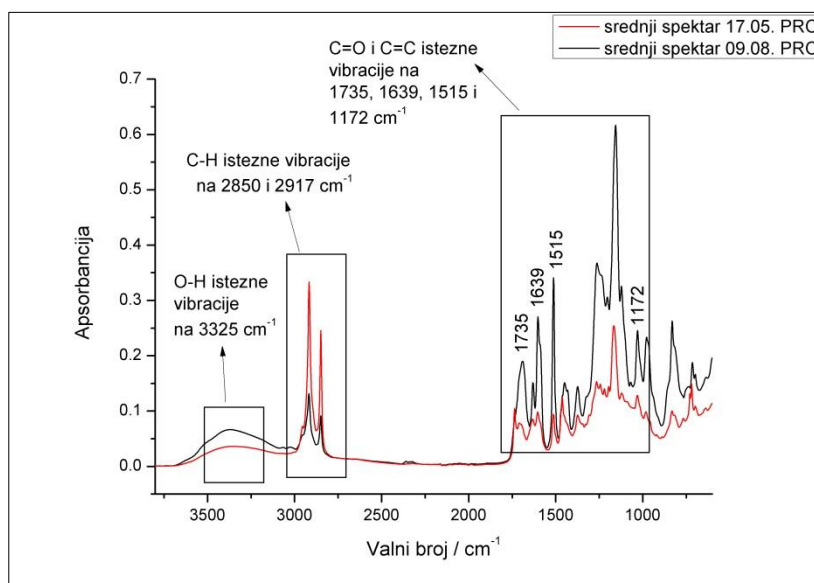
Grafikon 9. Srednji spektri pojedinih mjerenja (n=9) na lokaciji AGR



Grafikon 10. Srednji spektri pojedinih mjerenja (n=9) na lokaciji PRO

Iz dobivenih rezultata i uočenih spektralnih varijacija srednjih spektara pojedinih mjerenja na lokaciji PRO, može se također zaključiti kako su tijekom sezone radilice unosile smolaste i balzamske tvari različitih biljnih vrsta. Također, kao i kod AGR lokacije kod koje su znatno manje izražene spektralne varijacije, uzorkovanje u kolovozu (9. kolovoza) na PRO lokaciji rezultiralo je srednjim spektrom s jakim intenzitetom apsorpcijskih vrpca funkcionalnih skupina estera, fenola i flavonoida (1735 i 1172 cm^{-1} ; 3325 cm^{-1} ; 1639 i 1515 cm^{-1}) dok je uzorkovanje u svibnju (17. svibnja) pokazalo suprotno (manji intenzitet spomenutih vrpca) (grafikon 11). Također, simetrične i asimetrične vibracije C-H veza očituju

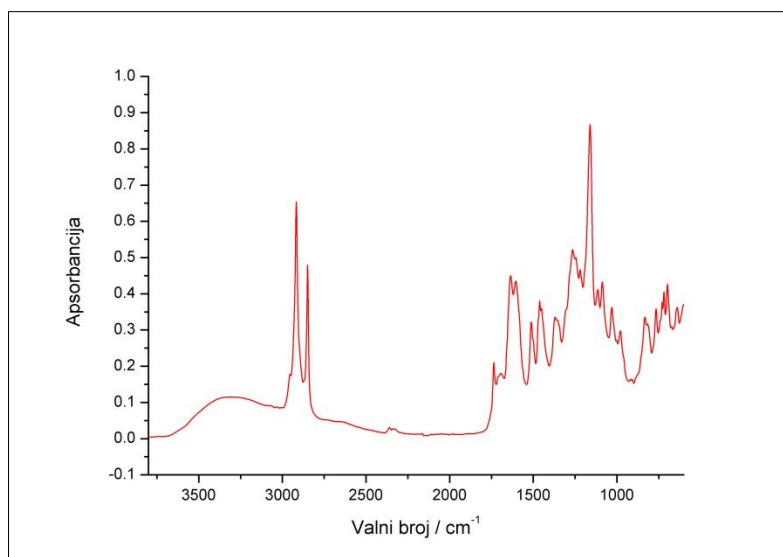
se kao apsorpcijske vrpce slabog intenziteta na 2850 i 2917 cm^{-1} (uzorkovanje 9. kolovoza), a one pripadaju ugljikovodicima iz pčelinjeg voska (Svečnjak, 2015), koji u kemijskom sastavu propolisa sudjeluje s 20-35 %. Dakle, u srednjem spektru uzoraka propolisa iz svibnja intenzitet vrpce na 2850 i 2917 cm^{-1} je bio viši nego u onima iz kolovoza te se dobiveni rezultati mogu povezati s dostupnošću propolisa koja se povećavala tijekom proizvodne sezone. Iz navedenog je razvidno kako postoji korelacija između udjela balzamskih tvari i pčelinjeg voska u uzorcima propolisa unesenim u pokusne zajednice na početku (svibanj) i na kraju sezone (kolovoz), odnosno kako radilice manju količinu prikupljenih balzamskih tvari nadomještaju dodatkom veće količine pčelinjeg voska.



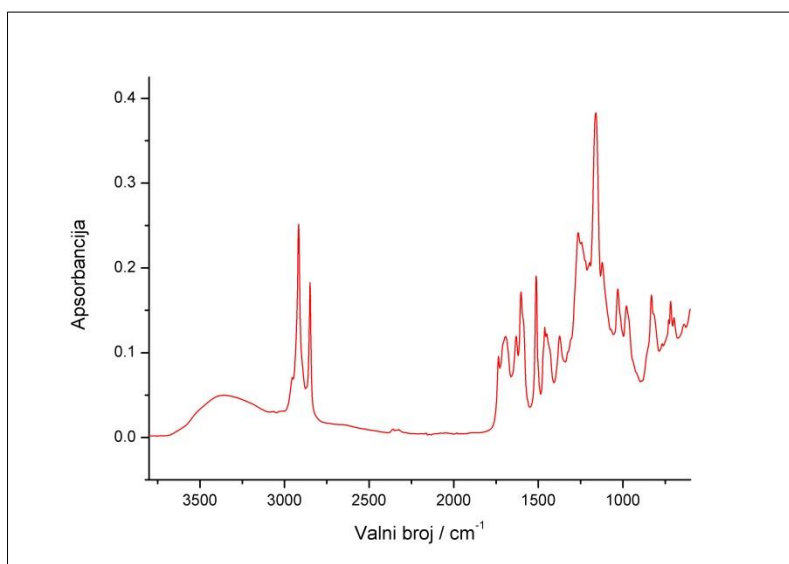
Grafikon 11. Srednji spektri uzoraka propolisa uzorkovanih 17. svibnja i 19. kolovoza na lokaciji Prolom s istaknutim spektralnim područjima

4.2.4. Rezultati analize propolisa s obzirom na lokaciju

Sastav propolisa, kao što je već navedeno, ovisi o zemljopisnom i botaničkom podrijetlu biljaka s kojih su skupljane smolaste i balzamske tvari, pa tako između propolisa skupljanog na AGR i PRO lokaciji također postoje razlike. Na grafikonu 12. prikazan je srednji spektar svih uzoraka propolisa skupljenih na lokaciji AGR, dok grafikon 13. prikazuje srednji spektar uzoraka s PRO lokacije.



Grafikon 12. Srednji spektar uzoraka propolisa s lokacije AGR (n=90)

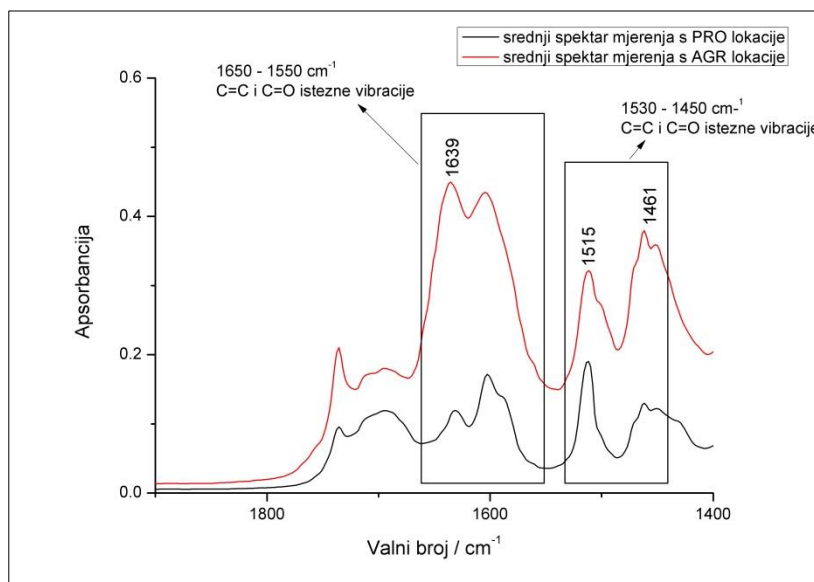


Grafikon 13. Srednji spektar uzoraka propolisa s lokacije PRO (n=90)

Rezultati su pokazali kako između srednjih spektara s lokacije AGR i PRO postoje značajne razlike u području “otiska prsta”, a najistaknutije su u spektralnom području od 1735 do 1515 cm^{-1} (istezne vibracije C=O esterskih veza) što je prikazano na grafikonu 14. Niži integralni intenzitet apsorbancije u tom području vidljiv je na srednjem spektru PRO lokacije.

Apsorpcijska vrpca na $\sim 1639 \text{ cm}^{-1}$ koja se javlja kao posljedica preklapajućih vibracija C=C veza aminokiselina i flavonoida, C=O isteznih vibracija proteina (Amid I) i NH_3 isteznih vibracija aminokiselina, bila je slabijeg intenziteta na PRO lokaciji, iz čega se može zaključiti kako je u uzorcima propolisa s AGR lokacije bio veći udio aminokiselina i flavonoida. Također, uočeno je kako se intenziteti apsorpcijskih vrpce u spektralnom području od 1650 do 1550 cm^{-1} razlikuju između AGR i PRO lokacija (obrnuta proporcionalnost intenziteta dviju vrpce u spomenutom području), a sličan je spektralni efekt vidljiv i u području od 1530 do

1450 cm^{-1} . Naime, rezultati su pokazali kako je u srednjem spektru uzoraka propolisa s AGR lokacije intenzitet apsorpcijske vrpce na 1515 cm^{-1} pripisane isteznim C=C vibracijama aromatskog prstena flavonoida viši u odnosu na intenzitet istezne deformacijske vibracije C-H veza i C=O aromatskog istezanja flavonoida na 1461 cm^{-1} , dok su suprotne spektralne značajke uočene na PRO lokaciji (viši intenzitet vrpce na 1515 cm^{-1} u odnosu na 1461 cm^{-1}). Navedena su opažanja potvrdila različit profil flavonoida na AGR i PRO lokaciji.



Grafikon 14. Srednji spektar mjerenja s AGR i PRO lokacije s istaknutim područjem od 1900 do 1400 cm^{-1}

Slična su zapažanja uočena u istraživanju švicarskih, talijanskih i bugarskih uzoraka (Bankova i sur., 2002) te se može zaključiti kako razlike u sadržaju fenola prirodno značajno variraju dok su neki spojevi, tipični za pojedinu biljnu vrstu s koje su smolaste i balzamske tvari skupljane, u potpunosti odsutni.

Nakon usporedbe uzoraka propolisa skupljenog na AGR i PRO pokusnim lokacijama, može se potvrditi razlika u sastavu propolisa koja je zasigurno rezultat različitog florističkog sastava na pokusnim lokacijama, a koja se primarno očituje u udjelu estera, flavonoida i fenola. Navedena opažanja mogu se povezati s istraživanjem raznolikosti propolisa s područja Portugala (Miguel i sur., 2010) gdje su dobiveni rezultati analize uzoraka propolisa bili u skladu s botaničkom raznolikošću istraživanog područja, a ukazali su kako radilice pronalaze alternativne izvore smolastih i balzamskih tvari u regijama u kojima topola nije prisutna.

5. Zaključci

Temeljem dobivenih rezultata utvrđeno je kako radilice ne unose propolis na različita mjesta u košnici u ovisnosti o kemijskom sastavu, tj. botaničkom podrijetlu obzirom da su uzorci sličnih spektralnih značajki uočeni u plodištu i medištu košnice.

Rezultati dobiveni spektralnom analizom uzoraka propolisa skupljenih svakih 14 dana tijekom proizvodne sezone (od travnja do kolovoza) pokazali su kako postoji korelacija između udjela balzamskih tvari i pčelinjeg voska u uzorcima propolisa unesenim u pokusne zajednice na početku (svibanj) i na kraju proizvodne sezone (kolovoz), odnosno kako radilice manju količinu prikupljenih balzamskih tvari nadomještaju dodatkom veće količine pčelinjeg voska.

Istraživanjem je također utvrđeno kako su radilice tijekom proizvodne sezone unosile smolaste i balzamske tvari različitih biljnih vrsta, što je u skladu s različitim florističkim sastavom na pokusnim lokacijama.

Ovim je istraživanjem po prvi puta analiziran sirovi propolis i njegov kemijski sastav. Iako je većina recentnih istraživanja usmjerena na ispitivanje etanolnog ekstrakta propolisa, pažnja bi se svakako trebala skrenuti i na analizu sirovog propolisa s obzirom na to da takav materijal predstavlja izvornu organsku matricu za sve proizvode na bazi propolisa.

Rezultati ovog istraživanja mogu poslužiti kao polazište za daljnja istraživanja kemijskog sastava sirovog propolisa primjenom FTIR-ATR spektroskopije, s naglaskom na kvantifikaciju sastavnica propolisa koja ovim istraživanjem nije provedena.

6. Literatura

1. Anđelković B., Vujisić Lj., Vučković I., Tešević V., Vajs V., Gođevac D. (2016). Metabolomics study of *Populus* type propolis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. [online] <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.12.003>>. Pristupljeno 10.svibnja 2018.
2. Bankova V., Bertelli D., Borba R., Conti B. J., Barbosa da Silva Cunha I., Danert C., Nogueira Eberlin M., Falcão S., Isla M. I., Nieva Moreno M I., Papotti G., Popova M., Basso Santiago K., Salas A., Frankland Sawaya A. C. H., Vilczaki Schwab N., Sforcin J. M., Finstrom M., Spivak M., Trusheva B., Vilas-Boas M., Wilson M. i Zampini C. (2016). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*. doi: 10.1080/00218839.2016.1222661 [online] <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00218839.2016.1222661>>. Pristupljeno 10.svibnja 2018
3. Bankova V., Marcucci M. C. (2000). Standardization of propolis: Present status and perspectives. *Bee World* 81, 182-188
4. Bankova V., Popova M., Bogdanov S. (2002). Chemical Composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results. *Zeitschrift fur Naturforschung*. 530-533. doi: 10.1515/znc-2002-5-622 [online] <<https://www.researchgate.net/publication/11248499>>. Pristupljeno 06.lipnja 2018.
5. Bertrams J., Kunz N., Müller M., Kammerer D., Stintzing F. C. (2013). Phenolic compounds as marker compounds for botanical origin determination of German propolis samples based on TLC and TLC-MS. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 86, 143–153
6. Bogdanov S. (2016). The Propolis Book, Chapter 1.: Propolis: Origine, Production, Composition. *Bee Product science*. [online] <www.bee-hexagon.net>. Pristupljeno 12. Svibnja 2018.
7. Bogdanov S., Bankova V. (2012). The Propolis Book. *Bee Product Science* [online] <www.bee-hexagon.net>. Pristupljeno 12. svibnja 2018.
8. Burdock G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem. Toxicol.* 36, 347-363.
9. Catalin Mot A., Silaghi-Dumitrescu R., Sarbu C. (2011). Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV–vis spectroscopic data. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24: 516-522
10. Dewi Yuliana N., Hanny Wijaya C., Nasrullah N. (2013). Classification of *Trigona* spp bee propolis from four regions in Indonesia using FTIR metabolomics approach. 13th ASEAN Food Conference, Meeting Future Food Demands: Security & Sustainability, Singapore
11. Do Nascimento T. G., Da Silva P. F., Azevedo F. L., Da Rocha G. L., De Moraes Porto I. C., Lima Moura T. F. A., Basílio-Júnior I. D., Grillo L. A., Dornelas C. B., da Silva Fonseca E. J., De Jesus Oliveira E., Zhang A. T., Watson D. G.

- (2016). Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. *Nanoscales research letters*. 11(1): 301
12. Douglas F. (2010). GC/MS Analysis. Scientific testimony. [online] <<http://www.scientific.org/tutorials/articles/gcms.html>>. Pristupljeno: 17. kolovoza 2018.
 13. Ernješ M. (2017). Određivanje polifenola i flavonola u propolisu UV-VIS spektrofotometrijom. Veleučilište u Požegi, Poljoprivredni odjel, Preddiplomski stručni studij prehrambene tehnologije. Završni rad
 14. Falcão S., Vale N., Gomes P., Rosario Domingues M. (2013). Phenolic Profiling of Portuguese Propolis by LC-MS Spectrometry: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides. *Phytochemical Analysis*.
 15. Food and agriculture organization of the united nations (FAO) (1996). The state of food and agriculture. Roma, Italy
 16. Franca J. R., De Luca M. P., Ribeiro T. G., Castilho R. O., Moreira A. N., Santos V. R., Faraco A. A. G. (2014). Propolis - based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 14: 478
 17. Ghisalberti E. L. (1979). Propolis: a review. *Bee World*. 60, 59-84.
 18. Günzler H., Gremlich H.-U. (2006). Uvod u infracrvenu spektroskopiju. Preveli Meić Z., Baranović G.. Školska knjiga. Zagreb
 19. Huang S., Zhang C. P., Wang K., Li G., Hu F. L. (2014). Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules* 19, 19610-19632.
 20. Isidorov V. A., Szczepaniak L., Bakier S. (2014). Rapid GC/MS determination of botanical precursors of Eurasian propolis. *Food Chemistry*. 142: 101-106.
 21. Johnsen L., Skou P., Khakimov B., Bro R. (2017). Gas chromatography – mass spectrometry data processing made easy. *Journal of Chromatography*. 1503: 57–64.
 22. Kartal M., Kaya S., Kurucu S. (2002). GC-MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey 2155. *Zeitschrift für Naturforschung*. 57 (9/10): 905-909
 23. Kezić N., Bubalo D., Grgić Z. i sur. (2013). Priručnik: konvencionalno i ekološko pčelarenje. CIP Katalogizacija, Zagreb.
 24. Kljenak A. (2017). Fitokemijske karakteristike i biološka aktivnost propolisa. Sveučilište u Splitu Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet. Diplomski rad
 25. Koester V. (2016). What is HPLC? *Chemistry Views Magazine*. [online] <https://www.chemistryviews.org/details/education/9464911/What_is_HPLC.html> Pristupljeno: 17. kolovoza 2018.
 26. Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S. (2003). Analysis of propolis from the continental and Adriatic regions of Croatia. *Acta Pharmaceutica*. 53: 275-285
 27. Kumar S., Jyotirmayee K., Sarangi M. (2012). Thin Layer Chromatography: A Tool of Biotechnology for Isolation of Bioactive Compounds from Medicinal

- Plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 18(1): 126-132
28. Lihong C. (2009). Advances in propolis research and propolis industry in China. *Journal Royal Inst Thailand* 1: 136-151
 29. Marcucci M. C. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 26: 83-99
 30. Menges F. (2015). Spekwin32 - optical spectroscopy software", Version 1.72.0, <http://www.effemm2.de/spekwin/>
 31. Miguel M. G., Nunes S., Dandlen S. A., Cavaco A. M., Antunes M. D. (2010). Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food Chem Toxicol*. 48: 3418–3423
 32. Nunes Oliveira R., Cordeiro Mancini M., Salles de Oliveira F. C., Passos T. M., Quilty B., da Silva Moreira Thiré R. M., McGuinness G. B. (2016). FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. *Revista Materia*. 21(3): 767-779
 33. Pavia D., Lampman G., Kriz G., Vyvyan J. (2009). *Introduction to spectroscopy*, fourth edition. Academic cengage, Belmont, USA
 34. Popova M., Trusheva B., Cutajar S., Antonova D., Mifsud D., Farrugia C., Bankova V. (2012). Identification of the Plant Origin of the Botanical Biomarkers of Mediterranean type Propolis. *Natural Product Communications*. 7 (5): 569-570
 35. Ristivojević P. M. (2014). *Određivanje hemijskog sastava, antioksidativnih i antimikrobnih svojstava propolisa topola tipa iz različitih regiona Srbije*. Univerzitet u Beogradu. Hemijski fakultet. Doktorska disertacija
 36. Ristivojević P., Trifković J., Andrić F., Milojković-Opsenica D. (2015). Poplar-type Propolis: Chemical Composition, Botanical Origin and Biological Activity. *Natural Product Communications*. Vol. 10 (11)
 37. Silici S., Kutluca S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*. 99: 69–73
 38. Simone-Finstrom M., Spivak M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*. 41(3):295-311
 39. Skoog D. A., Leary J. J. (1992). *Principles of Instrumental Analysis*, fourth edition. Saunders College Publishing, Philadelphia, USA
 40. Socrates G. (2001). *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies Tables and Charts*. John Wiley & Sons LTD, New York, USA. 366 pp.
 41. Svečnjak L. (2015). *Infracrvena spektroskopija u indentifikaciji botaničkog i zemljopisnog podrijetla meda*. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet. Doktorska disertacija
 42. Svečnjak L., Baranović G., Vinceković M., Prđun S., Bubalo D., Tlak Gajger I. (2015). An approach for routine analytical detection of beeswax adulteration using FTIR-ATR spectroscopy. *Journal of Apicultural Science*. 59(2): 37-49
 43. Verma N. (2012). *UV-Vis Spectrophotometer*. Research And Development, Indian institute od technology, Kanpur. [online]

<https://www.iitk.ac.in/dordold/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=219&Itemid=238>. Pristupljeno: 17. kolovoza 2018.

44. Wu Y. W., Sun S. Q., Zhao J., Li Y., Zhou Q. (2008). Rapid discrimination of extracts of Chinese propolis and poplar buds by FT-IR and 2D IR correlation spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*. 883-884: 48-54

7. Životopis

Soledad-Dea Jerman rođena je 20. svibnja 1993. godine u Zagrebu. Ondje je pohađala osnovnu Waldorfsku školu do 2008. kada upisuje Privatnu umjetničku gimnaziju u Zagrebu. Nakon dvije godine prebacuje se u gimnaziju Tituša Brezovačkog gdje završava srednjoškolsko obrazovanje 2011. godine. Iste godine upisuje preddiplomski studij Prehrambene tehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, a 2016. upisuje diplomski studij Ekološke poljoprivrede i Agroturizma na Agronomskom fakultetu u Zagrebu.