

Inkapsulacija propolisa kao izvor polifenolnih spojeva

Štrkalj, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:526396>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-30**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



INKAPSULACIJA PROPOLISA KAO IZVOR POLIFENOLNIH SPOJEVA

DIPLOMSKI RAD

Marko Štrkalj

Zagreb, travanj, 2021.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Hortikultura-Voćarstvo

**INKAPSULACIJA PROPOLISA KAO IZVOR
POLIFENOLNIH SPOJEVA
DIPLOMSKI RAD**

Marko Štrkalj

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Marko Vinceković

Zagreb, travanj, 2021.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Marko Štrkalj**, JMBAG 0178104665, rođen 11. svibnja 1996. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

INKAPSULACIJA PROPOLISA KAO IZVOR POLIFENOLNIH SPOJEVA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam 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 upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta **Marko Štrkalj**, JMBAG 0178104665, naslova

INKAPSULACIJA PROPOLISA KAO IZVOR POLIFENOLNIH SPOJEVA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

1. izv. prof. dr. sc. Marko Vinceković mentor
2. doc. dr. sc. Nenad Jalšenjak član
3. doc. dr. sc. Lidija Svečnjak član

potpisi:

Zahvala

Ovaj rad posvećujem svojoj obitelji. Mama, tata, Josip, Dominik i Maria, hvala vam. Zahvaljujem se i svima ostalima koji su bili uz mene za vrijeme studiranja.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Cilj rada.....	2
2. Pregled literature	3
2.1. Polifenoli	3
2.1.1. Polifenoli u hrani.....	4
2.1.2. Polifenoli kao antioksidansi	5
2.2. Propolis.....	7
2.2.1. Skupljanje propolisa	7
2.2.2. Fizikalna svojstva i uloga propolisa u košnici	9
2.2.3. Kemijska svojstva i sastav propolisa	10
2.2.4. Upotreba i antiseptička svojstva propolisa.....	13
3. Tehnike inkapsulacije propolisa.....	17
3.1. Fizikalne metode.....	17
3.1.1. Sušenje raspršivanjem (<i>Spray-Drying</i>).....	17
3.1.2. Procesi inkapsulacije upotrebom superkritičnih tekućina.....	18
3.1.2.1. Superkritična metoda protuotapalom.....	20
3.1.2.2. Čestice nastale procesiranjem otopinama zasićenim plinovima.....	21
3.2. Fizikalno kemijske metode.....	21
3.2.1. Inkapsulacija hlađenjem emulzija	21
3.2.2. Emulgiranje - metoda uklanjanjem otapala.....	21
3.3. Metode temeljene na ionskim interakcijama	23
3.3.1. Ionsko geliranje	23
3.3.2. Kompleksna koacervacija.....	24
3.4. Kemijske metode	25
3.4.1. <i>In Situ</i> polimerizacija.....	25
3.4.2. Interfacijalna polikondenzacija i umrežavanje	25
4. Inkapsulirani propolis kao izvor polifenola	28
5. Zaključak.....	30
6. Literatura.....	31

Životopis 37

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Marko Štrkalj**, naslova

INKAPSULACIJA PROPOLISA KAO IZVOR POLIFENOLNIH SPOJEVA

Propolis je izvor prirodnih polifenola. Polifenoli su spojevi koji imaju antioksidativna svojstva. To svojstvo čini polifenole zanimljivim za liječenje različitih bolesti poput upale ili raka, ali i za svrhe protiv starenja u kozmetičkim formulacijama ili za prehrambene primjene. Nažalost, ova svojstva odgovorna su i za nedostatak dugoročne stabilnosti, što ove prirodne spojeve čini vrlo osjetljivim na svjetlost i toplinu. Osim toga mnoge od ovih molekula posjeduju vrlo gorak okus, što ograničava njihovu upotrebu u hrani ili oralnim lijekovima. Kako bi se zaobišli ovi nedostaci, pristupilo se metodama inkapsulacije radi dobivanja propolisa u inkapsuliranom obliku. U ovom radu je dan pregled metoda koje se koriste u procesu inkapsulacije propolisa koji se može koristiti kao izvor polifenola.

Ključne riječi: propolis, polifenoli, antioksidacijska svojstva, inkapsulacija, stabilnost

Summary

Of the master's thesis - student **Marko Štrkalj**, entitled

ENCAPSULATION OF PROPOLIS AS A SOURCE OF POLYPHENOL COMPOUNDS

Propolis is a source of natural polyphenols. Polyphenols are compounds that have antioxidant properties. This property makes polyphenols interesting for the treatment of various diseases such as inflammation or cancer, but also for anti-aging purposes in cosmetic formulations or nutritional applications. Unfortunately, these properties are also responsible for the lack of long-term stability, which makes these natural compounds very sensitive to light and heat. Besides, many of these molecules possess a very bitter taste, which limits their use in food or oral medications. To circumvent these shortcomings, delivery systems have been developed using encapsulation methods. This paper provides an overview of the methods used in the process of encapsulation of propolis that can be used as a source of polyphenols.

Keywords: propolis, polyphenols, antioxidant potential, encapsulation, stability

1. Uvod

Svjedoci smo sve veće osviještenosti populacije i sve većeg broja pojedinaca o važnosti kvalitetne i balansirane prehrane u održavanju zdravog i vitalnog života. U posljednje vrijeme se također sve više pridaje važnost brizi o prevenciji bolesti korištenjem raznih pripravaka na biljnoj bazi ili hrane koja je bogata pojedinim spojevima koji su korisni za ljudsko zdravlje. Imajući to na umu može se zaključiti kako kombiniranje suvremene i alternativne medicine sve više dobiva na važnosti, ali i popularnosti, što može biti povezano s promjenama navika potrošača, promjenama trendova ili pak povećanjem ekološke osviještenosti populacije.

Korištenje ljekovitog bilja, biljnih pripravaka ili sličnih proizvoda ima uglavnom ulogu u prevenciji raznih bolesti, a tu se najviše spominju rak i kardiovaskularne bolesti te sezonske bolesti poput prehlade čija se prevencija temelji na ojačavanju djelovanja imunološkog sustava konzumiranjem prirodnih ljekovitih pripravaka. Mehanizam djelovanja alternativne medicine temelji se na sinergijskom djelovanju velikog broja raznih spojeva kao što su polifenoli, vitamini i ostali korisni spojevi od kojih svaki ima neku ulogu u metabolizmu, a zajedno mogu postići stimulativno djelovanje na imunitet.

Jedna od glavnih prednosti ljekovitog bilja i hrane ili dodataka prehrani je antioksidativni učinak. U ljudskom organizmu svakodnevnim odvijanjem kemijskih reakcija metabolizma nastaju štetni slobodni radikali koji mogu biti uzročnici raznih bolesti, a među njima je i rak. Unosom dovoljne količine antioksidansa tijelo održava razinu slobodnih radikala u prihvatljivim koncentracijama jer antioksidansi imaju sposobnost vezivanja i neutralizacije slobodnih radikala. Zbog te činjenice je potrebno svakodnevno unositi dovoljno antioksidansa putem hrane i dodataka prehrani. Tvari odgovorne za antioksidacijsku aktivnost dobrim dijelom su polifenoli. Ti spojevi su široko rasprostranjeni u prirodi u namirnicama biljnog podrijetla međutim karakterizira ih slaba stabilnost odnosno podložnost degradaciji pod utjecajem UV zračenja i visoke temperature. Također ljudsko tijelo ne može iskoristiti sve polifenole unesene prehranom jer se dio polifenola gubi u procesu probave te je jako važno svakodnevno unošenje dovoljnih količina polifenola.

Jedan od izvora polifenola je i propolis koji osim antioksidativnog posjeduje još i antibakterijsko, antigljivično i antitumorno djelovanje kao i stimulativno djelovanje na imunološki sustav. Propolis je prirodni proizvod biljnog podrijetla kojeg pčele skupljaju i prerađuju kako bi njime dezinficirale košnicu i koristile ga kao ljepilo. Propolis se najčešće koristi u obliku tinkture ali takav ima izrazito gorak okus što ograničava njegovu primjenu, međutim taj problem se može učinkovito riješiti inkapsulacijom. Inkapsulacija je proces proizvodnje malih (mikro) kapsula koje su građene od tvari omotača i aktivne tvari koja je u ovom slučaju propolis. Na taj način prilikom konzumacije se ne osjeti njegov gorak okus ali također se štiti od fotooksidacije na koju je propolis osjetljiv. Sva svojstva propolisa detaljno su opisana u sljedećim poglavljima.

O zdravstvenim dobrobitima propolisa svjedoči velik broj znanstvenih radova koji su temeljeni na istraživanjima i jasno ističu izrazito povoljan kemijski sastav propolisa koji je odličan izvor korisnih polifenolnih spojeva. Unatoč svim dobrobitima alternativne medicine

nikako ne treba zanemariti suvremenu medicinu i sve ljekovite pripravke potrebno je koristiti s oprezom.

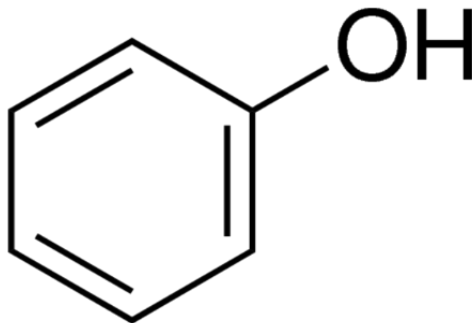
1.1. Cilj rada

Cilj ovog rada bio je dati pregled znanstvenih i kompilacijskih radova objavljenih na temu kemijskog sastava, fizikalnih i bioloških svojstava propolisa te radova koji istražuju načine inkapsulacije i svojstva inkapsuliranog propolisa te utvrditi razloge odnosno prednosti inkapsuliranja propolisa. Osim toga, cilj ovog rada bio je i usporediti karakteristike propolisa koji nije inkapsuliran (najčešće alkoholna tinktura) i inkapsuliranog propolisa.

2. Pregled literature

2.1. Polifenoli

Fenoli su aromatski sekundarni biljni metaboliti koji su građeni od jednog ili više aromatskih prstena na kojim se nalazi barem jedna hidroksilna skupina (OH). Međutim osim OH-skupine, u strukturi fenola, mogu biti prisutne i mnoge druge funkcionalne skupine kojih može biti i više na jednom prstenu što rezultira izrazito visokom heterogenošću fenola. U fenole ubrajamo približno 8000 spojeva kojima je zajednička osnovna struktura sačinjena od aromatskog prstena i OH-skupine. Polifenoli su složeni fenoli koji su građeni od barem dvije fenolne podjedinice (Jolić, 2017). Slika 2.2.1. prikazuje osnovnu kemijsku strukturu fenola s aromatskim prstenom i OH-skupinom.

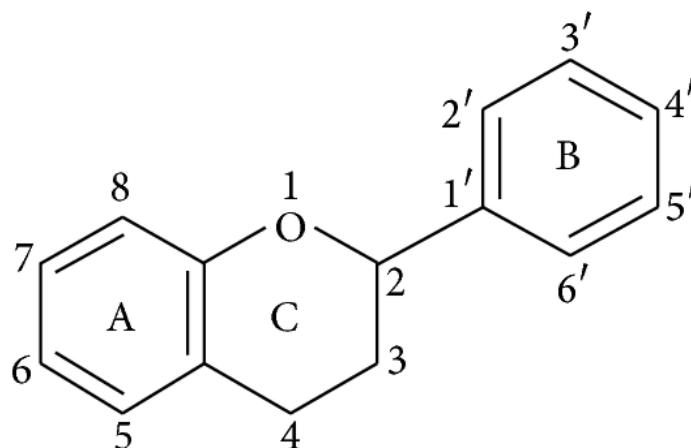


Slika 2.2.1. Osnovna kemijska struktura fenola
Izvor: Jolić (2017)

Fenoli mogu biti jednostavne molekule poput fenolnih kiselina, ali također i polimerizirani spojevi poput tanina (Bravo, 1998). U prirodi fenole najčešće nalazimo kao konjugate s monosaharidima i polisaharidima, a prisutni su i kao esteri i metilni esteri (Jolić, 2017). Glavni izvor polifenola su biljke kojima služe između ostalog za obranu od patogena, pigmentaciju, obranu od UV zračenja, rast i razmnožavanje (Ernješ, 2017).

Polifenoli se dijele na dvije skupine, flavonoide i neflavonoide. U flavonoide spadaju: flavonoli, flavoni, flavan-3-oli, antocijani, flavanoni i izoflavoni, a u neflavonoide: fenolne kiseline, hidroksicinamati i stilbeni (Lovrić, 2014).

Flavonoidi su podskupina polifenola, derivati benzo- γ -pirona, koji su građeni od 15 ugljikovih atoma $C_6-C_3-C_6$ tj. Dva benzenska prstena (A i B, slika 2.2.2.) povezana s propanskim lancem (C). Razlikuju se prema položaju B prstena, prisutnosti karbonilne skupine na C4 atomu, oksidacijskom statusu C prstena, broju i položaju OH i metoksi skupina i vrsti, broju i položaju šećernih ostataka vezanih na aglikonsku strukturu, a to su najčešće D-glukoza, D-galaktoza, L-ramnoza, L-arabinoza, D-ksiloza, D-galakturonska kiselina i disaharid rutinoza (Morović, 2018).



Slika 2.2.2. Osnovna struktura flavonoida
Izvor: Morović (2018)

Flavonoidi su najbrojniji i najrašireniji fenolni spojevi. Nalaze se gotovo u svim dijelovima biljke, najviše u fotosintetskim stanicama, a pojedini flavonoidi su biljni pigmenti (antocijani). Apсорbiraju UV zračenje i inhibiraju stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva ali djeluju i na već prisutne reaktivne kisikove spojeve, važni su u regulaciji biljnog hormona rasta auksina (Kumar i Pandey, 2013). Osim toga flavonoidi imaju obrambenu ulogu u biljci (napad patogeni) te su posrednici u simbiozi biljaka i mikroorganizama, konkretno kod fiksacije dušika od strane mahunarki (Morović, 2018).

2.1.1. Polifenoli u hrani

Polifenoli su prisutni u raznim namirnicama biljnog podrijetla kao što su voće, povrće, žitarice, vino, pivo, čajevi itd. ali njihov udio jako varira ovisno o biljnoj vrsti, sorti, okolišnim čimbenicima rasta biljke pa i načinu skladištenja biljnih proizvoda (npr. oksidacija čajeva). Najveća koncentracija polifenola većinom je u lišću. Namirnice koje se ističu visokim udjelom polifenola su mahunarke, voće, cijeđeni sokovi, čajevi i crno vino (Bravo, 1998). Voće tamnije boje sadrži višu koncentraciju polifenola od svjetlijeg voća (Gajdašić, 2018).

Polifenoli u ljudskom organizmu imaju povoljan utjecaj na prevenciju kardiovaskularnih bolesti, raka, osteoporoze, dijabetesa i neurodegenerativnih bolesti. Moduliraju aktivnost raznih enzima i staničnih receptora, stupaju u interakciju s raznim signalnim putevima i tako utječu na transdukciju signala, a isto tako i reguliraju stanični ciklus i povoljno utječu na funkciju trombocita (Šimunić, 2016). Gajdašić (2018) u istraživanju potvrđuje protutumorsku aktivnost polifenolnih spojeva *in vitro*. Ekstrakt polifenola je inhibirao rast stanica tumora za 56,6%. Kumar i Pandey (2013) navode da postoji mogućnost pozitivnog djelovanja flavonoida u bobičastom voću na Parkinsonovu bolest i poboljšanje pamćenja kod ljudi starije životne dobi. Također polifenoli povoljno djeluju na zdravlje zbog svog antimikrobnog djelovanja protiv virusa, gljivica, bakterija i parazita (inhibiraju djelovanje pojedinih štetnih mikroorganizama), antiartritičnog djelovanja i pomažu u održavanju optimalne razine glukoze

jer inhibiraju apsorpciju glukoze u tankom crijevu i ograničavaju njezinu reapsorpciju u bubrezima što pridonosi liječenju dijabetesa (Kadoić, 2015).

Ljudsko tijelo ne može iskoristiti sve polifenole koji bivaju unešeni prehranom. Razlog tome je gubitak značajnog dijela polifenola u procesu probave hrane pa je njihova koncentracija u krvi podosta niža od ukupne količine unesene hranom. Veliki dio flavonoidnih metabolita ljudsko tijelo na kraju izluči putem bubrega (Kadoić, 2015). Osim slabe biodostupnosti, svojstvo polifenola je i slaba stabilnost. Osjetljivi su na UV zračenje i visoku temperaturu. Djelovanjem UV zračenja dolazi do foto-degradacije polifenola, a moguć je gubitak i do 85% pojedinih polifenola nakon izloženosti UV svjetlosti od osam sati. Visoke temperature također dovode do degradacije pojedinih polifenola i to od 20% pri 60 °C te 32% pri 100 °C. Različiti polifenoli imaju različitu toleranciju na UV zračenje i visoku temperaturu (Ličanin, 2016). Flavonoidi su isključivo proizvod biljaka pa ih ljudi ni životinje ne mogu sintetizirati, a osim već navedenog hrani daju okus i boju (Kumar i Pandey, 2013).

2.1.2. Polifenoli kao antioksidansi

U organizmu može doći do povećanog stvaranja štetnih slobodnih radikala tj. do pomaka ravnoteže staničnih oksidacijsko-redukcijskih reakcija u smjeru oksidacije. Takvo stanje naziva se oksidacijski stres (Kadoić, 2015). Do tog stanja dolazi ako je stvaranje slobodnih radikala pojačano ili ako je antioksidativna zaštita organizma smanjena, a može rezultirati oštećenjem stanica, točnije lipida, proteina i nukleinskih kiselina u stanici. Slobodni radikali nastaju u uobičajenim fiziološkim procesima ali u manjim količinama tako da je organizam u stanju ravnoteže sve dok njihovo stvaranje ne prelazi sposobnost njihova kataboliziranja. Antioksidativni stres se može spriječiti dovoljnom količinom antioksidansa u organizmu, a u protivnom potiče razvoj raznih bolesti kao što su poremećaji imunološkog sustava (arthritis, multipla skleroza), kardiovaskularne bolesti (ateroskleroza, hipertenzija, kardiomiopatija, infarkt miokarda), plućne bolesti, bolesti bubrega i probavnog sustava, bolesti središnjeg živčanog sustava (Parkinsonova i Alzheimerova bolest), oštećenja vida, dijabetes te također potiče starenje (Vehtersbah-Stojan, 2015).

Slobodni radikali su atomi i molekule koji sadrže barem jedan nespareni elektron u vanjskoj orbitali. Oni su energetske nestabilni, visokoreaktivni i podložni reakcijama s velikim brojem raznih molekula, a mogu nastati u procesu oksidativne fosforilacije, aktivacijom imunosnih stanica, kemotaksijom, apoptozom, koagulacijom, mentalnim stresom, ishemijom, infekcijom, starenjem, konzumiranjem zagađene vode ili udisanjem zagađenog zraka ili dima cigareta, konzumiranjem alkohola ili pojedinih lijekova, izloženosti zračenju itd. Najvažniji slobodni radikali su reaktivni kisikovi spojevi – ROS (eng. *reactive oxygen species*) i reaktivni dušikovi spojevi – RNS (eng. *reactive nitrogen species*). Tijelo na povećanu koncentraciju ROS-a odgovara povećanjem koncentracije glutaciona i proteina koji mogu hvatati ROS te se tako održava ravnoteža međutim kod kontinuiranih i izrazito povišenih koncentracija ROS-a tijelo se nije u stanju samo obraniti što rezultira poremećajem funkcija lipida i proteina te mutacijama DNA. U takvom slučaju tijelu je potreban unos antioksidansa. Oni imaju

sposobnost uspješne neutralizacije već postojećih slobodnih radikala, inhibicije stvaranja novih slobodnih radikala i popravljivanja oštećenja stanica prouzročenih njihovim djelovanjem. Antioksidansi mogu biti enzimi, proteini i male molekule kao na primjer vitamin C ili flavonoidi (Vehtersbah-Stojan, 2015). Polifenoli imaju fenolnu skupinu, odnosno aromatski prsten s OH-skupinom te su zbog toga vrlo dobri antioksidansi. Fenolna skupina prima elektron i stvara fenoksil-radikal, relativno stabilni radikal i tako se prekida lančana reakcija oksidacije u stanicama što znači da polifenoli hvataju slobodne radikale tj. reduciraju oksidanse. Polifenoli koji imaju kateholnu skupinu odnosno aromatski prsten s dvije OH-skupine u orto položaju imaju veću antioksidacijsku sposobnost od jednostavnijih polifenola (Kadoić, 2015).

2.2. Propolis

Propolis je ljepljiva smolasta tvar koju medonosne pčele (*Apis mellifera* L.) skupljaju s pupoljaka raznih biljaka, miješaju ga s voskom i koriste za popunjavanje pukotina u košnici (Bankova i sur., 2002), dezinfekciju i održavanje košnice čistom (Ristivojević, 2014), učvršćivanje okvira (Relić, 2015), te oblaganje uginulih insekata i drugih uljeza (mumifikacija) (Plavša i Nedić, 2015). Propolis se od davnina koristi u narodnoj medicini zbog svojih antioksidativnih, imunostimulacijskih, antibakterijskih, antikancerogenih i antigljivičnih svojstava (Burdock, 1998). Upotreba, podrijetlo i uloga propolisa spominju se još u rimskim i grčkim izvorima iz prvog stoljeća, a svoje mjesto propolis je pronašao i u djelima europskih autora iz razdoblja Novoga vijeka, kao i u suvremenoj literaturi.

2.2.1. Skupljanje propolisa

Unutar vrste medonosne pčele (*Apis mellifera* L.) postoji niz različitih pasmina koje se sve odlikuju različitim individualnim karakteristikama kao što su: duljina rilca, boja pčele, sklonost rojenju, agresivnost ali i sklonost skupljanju propolisa. Na području Europe postoje četiri pasmine, a to su: *Apis mellifera mellifera* (tamna europska pčela), *Apis mellifera caucasica* (kavkaska pčela), *Apis mellifera ligustica* (žuta, talijanska pčela) i *Apis mellifera carnica* (siva, kranjska pčela) (Ristivojević, 2014). Kavkasku pčelu karakterizira iznimno jak nagon za skupljanjem propolisa pa tako skupi i do tri puta veću količinu propolisa od talijanske pčele. Na području Hrvatske je zastupljena siva pčela koja prostor košnice obljepljuje manje od ostalih pasmina pčela. Skupljanje propolisa je zaduženje specijaliziranih radilica u zadnjoj fazi svog života, a glavninu propolisa pčelinja zajednica skupi za vrijeme ljeta i jeseni. Za vrijeme najtoplijeg dijela dana radilice odlaze do pupoljaka raznih biljaka, uglavnom drvenastih, bogatih balzamskim i smolastim tvarima i čeljustima otkidaju dijelove smole i smještaju ih u košarice stražnjih nogu poput polena. Samo punjenje košarica traje između 15 i 60 minuta (Kezić i sur., 2014). U jednom letu radilice, ona donese oko 10 mg propolisa pomiješanog sa sekretom žlijezde slinovnice (Bogdanov i Bankova, 2016). Bogdanov i Bankova (2016) navode da pčele, osim s pupova, smolaste i balzamske tvari skupljaju s lišća, grana i debla. Neke od vrsta bogatih smolom s kojih pčele skupljaju propolis su: vrbe, breza, topola, kesten, trešnja, višnja, hrast, citrusi i još mnoge biljne vrste (Ristivojević, 2014).

Pčele propolisom najviše lijepe mjesta gdje se okviri dodiruju sa zidom košnice, gdje se okviri dodiruju međusobno i na mrežastim otvorima za ventilaciju iznad i sa strane gnijezda (Relić, 2015). Imajući to u vidu, pčelari propolis skupljaju struganjem sa unutarnjih dijelova košnice ili pomoću skupljača propolisa (mrežice). Skupljač se postavlja na gornji nastavak košnice s podignutim krovom od nekoliko milimetara jer tada dolazi do strujanja zraka kroz košnicu što potiče pčele na zatvaranje otvora na skupljaču propolisom (Jerman, 2018). Razni izvori navode da se prosječno godišnje od jedne pčelinje zajednice može skupiti između 50 i 150 grama propolisa (Simone-Finstrom i Spivak, 2010), (Bogdanov i Bankova, 2016), međutim

2008. godine je provedeno specifično istraživanje u kojem su korištene silikonske mreže za skupljanje. Utvrđeno je da nakon 30 dana pčele prosječno prikupe 30,45 g, a nakon 90 dana 117,15 grama propolisa po zajednici na silikonskoj mrežici (Ramljak, 2008).



Slika 2.1.1.1. Skupljanje propolisa struganjem

Izvor: Ballot-Flurin (<https://en.ballot-flurin.com/our-philosophy/bee-sourced-materials/propolis>)



Slika 2.1.1.2. Silikonska mreža za skupljanje propolisa

Izvor: Planet Organic (<https://www.planetorganic.com/whats-inside-toca-honey-propolis/>)

Na slikama su vidljiva dva načina skupljanja propolisa. Slika 2.1.1.1. prikazuje skupljanje propolisa struganjem, a slika 2.1.1.2. prikazuje skupljanje propolisa pomoću mreže. Na slici 2.1.1.1. je također vidljivo da pčele propolisom lijepe područje između dva nastavka košnice.

2.2.2. Fizikalna svojstva i uloga propolisa u košnici

Etimologija riječi propolis govori puno o njegovoj ulozi u košnici jer se sastoji od grčkih riječi „*pro*“ što znači ispred i „*polis*“ što znači grad. Značenje sintagme „ispred grada“ upućuje na zaštitnu ulogu propolisa u košnici, a može se povezati i sa činjenicom da pčele propolisom obljepljuju ulaz u košnicu. Sam prijevod grčke riječi *propolis* (ljepilo) isto tako govori o njegovoj ulozi i svojstvima (Bogdanov i Bankova, 2016).

Konzistencija propolisa ovisi o temperaturi, pri nižim temperaturama propolis je tvrd i krhak, a pri višim se rasteže. Bogdanov i Bankova (2016) navode kako je propolis na temperaturi iznad 30 °C mekan i rastezljiv, dok je na temperaturi ispod 15 °C krut i lomljiv. Topi se na 80-105°C. Topi se na 65-70 °C. Kezić i sur. (2014) te Bogdanov i Bankova (2016) navode da boja propolisa ovisi o biljnoj vrsti s koje je skupljen i može biti žute, zelene, ružičaste i crne boje te u raznim nijansama. Okus i miris također ovise o botaničkom podrijetlu ali vrlo često je oporo-gorkog okusa. Propolis se vrlo slabo otapa u hladnoj vodi, u vrućoj vodi se otopi između 7 i 10%, u eteru do 66%, u acetonu 20 do 40%, a u etilnom alkoholu između 50 i 75%. Specifična težina propolisa je od 1,112 do 1,136 g/cm³ (Plavša i Nedić, 2015).

Propolis u košnici ima konstrukcijsku i dezinfekcijsku ulogu. Pčele ga koriste za popunjavanje svih rupa, pukotina i oštećenja veličine do 3 mm. Na taj način onemogućuju ulazak drugih nepoželjnih životinja u košnicu ali se također brane od hladnoće u zimskom periodu (Relić, 2015). Osim toga pčele propolisom učvršćuju okvire kako bi bili fiksni, a na jesen obljepljuju i na taj način smanjuju leto, ulaz u košnicu.



Slika 2.1.2.1. Propolis na okvirima

Izvor: Uganda Honey (<https://ugandahoney.wordpress.com/2008/12/03/house-cleaning/>)

Slika 2.1.2.1. prikazuje unutrašnjost košnice, točnije okvire koji su učvršćeni propolisom koji je u ovom slučaju gotovo crne boje.

S obzirom da je propolis prirodni antiseptik, pčele njime obljepuju unutrašnjost košnice gdje se zatim njegovim isparavanjem stvara nepovoljna mikroklima za život i razvoj raznih vrsta gljivica i bakterija. U slučaju kada u košnicu uđe i ugine neka mala životinja (miševi, puževi) ili veći insekt kojeg pčele fizički ne mogu iznijeti van, njegov leš obljepuju propolisom kako bi se spriječio proces raspadanja (Kezić i sur., 2014). Prema Bogdanovu i Bankovoj (2016), pčele na donji dio ulaza u košnicu lijepe sloj propolisa kako bi svaka pčela koja dolijeće stala na propolis prije ulaska i na taj način se dezinficirala.

2.2.3. Kemijska svojstva i sastav propolisa

Točan sastav propolisa ovisi o botaničkom podrijetlu jer pčele odlaze na razne biljne vrste prilikom skupljanja. Samim time sastav propolisa ovisi i o geografskom položaju, nadmorskoj visini, klimi itd. Također postoji korelacija između kemijskog sastava propolisa i boje propolisa zbog činjenice da boja ovisi o botaničkom podrijetlu što upućuje na to da kemijski sastav ovisi o boji. Unatoč tome većina autora se slaže da u sastavu propolisa ima podjednak udio glavnih komponenata. Prema Ahangari i sur. (2018), propolis se sastoji od 50-70 % smolastih i balzamskih tvari, 30-50 % voska, 5-10 % peludi i ostalih brojnih sastojaka između kojih su aminokiseline, mineralne tvari, šećeri, vitamini, flavonoidi, fenoli i aromatske tvari. Isti autori navode da sastav propolisa ovisi o pasmini pčele. Kezić i sur. (2014) navode kako propolis sadrži 50 % biljnih smola i balzama, 30 % voska, 10 % aromatskih i esencijalnih ulja, 5 % peluda i 5 % različitih organskih tvari, a precizniji sastav propolisa je podjela u tri skupine: polifenoli i općenito aromatske tvari (flavonoidi, fenolske kiseline, fenoli, alkoholi i aromatski aldehidi, kumarini), terpeni (esencijalna ulja), i aminokiseline, polisaharidi, minerali, vitamini A, C, E i vitamini B skupine. U istraživanju iz 2018. Jerman zaključuje da postoji razlika u udjelima voska i smolastih i balzamskih tvari ovisno o razdoblju u godini, odnosno kada pčele skupe manje balzamskih i smolastih tvari, tu razliku nadomjestite većim udjelom voska.

Pčele prilikom prerade propolisa dodaju enzim β -glukozidazu što rezultira hidrolizom fenolnih spojeva, npr. flavonoidnih heterozida na slobodne flavonoidne aglikone i šećere što dovodi do poboljšanja farmakološkog djelovanja propolisa (Kosalec i sur., 2003). Isti autori su 2003. godine u istraživanju usporedili kemijski sastav odnosno udio polifenola i njihove podskupine flavonoida u propolisu otopljenom u alkoholu, područja kontinentalnog i mediteranskog dijela Hrvatske. Tablice 2.1.3.1. i 2.1.3.2. prikazuju usporedbu udjela pojedinih sastojaka propolisa u kontinentalnom i u mediteranskom dijelu Hrvatske ali i ukupni udio polifenola i flavonoida u uzorcima propolisa. Iz tablica se može iščitati da je pinocembrin najzastupljeniji flavonoid u propolisu. Prosječni udio polifenola iznosi 9,69 % u kontinentalnom i 9,02 % u mediteranskom dijelu Hrvatske. Uzorci su analizirani metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti - HPLC (engl. *High performance liquid chromatography*).

Tablica 2.1.3.1. Analiza pojedinih sastojaka propolisa iz kontinentalnog dijela Hrvatske

Sastojak (%)	Broj uzorka											
	5499	5274	5274b	23	18	26	29	35	28	31	25	\bar{x}
Kafeinska kiselina	2,76	1,34	2,48	1,32	2,09	0,59	1,02	0,78	1,78	0,69	0,27	1,37
Naringenin	0,32	0,32	0,63	0,28	2,41	0,31	0,22	0,25	1,02	0,34	0,46	0,6
Krizin	1,33	0,98	1,34	2,06	2,45	2,02	1,34	1,66	1,76	5,32	0,22	1,86
Pinocembrin	2,41	1,53	2,66	3,98	3,06	4,74	2,92	3,32	2,71	3,96	/	2,84
Galangin	0,49	0,42	0,69	1,4	2,12	1,52	1,28	1,28	/	/	/	0,84
Ukupni flavonoidi	4,56	3,25	5,31	7,71	10,05	8,58	5,8	6,5	5,48	6,88	0,68	5,9
Ukupni polifenoli	7,3	4,63	7,79	12,34	14,78	16,03	7,69	10,14	11,36	11,82	2,66	9,69

Izvor: Kosalec i sur. (2003)

Tablica 2.1.3.2. Analiza pojedinih sastojaka propolisa iz mediteranskog dijela Hrvatske

Sastojak (%)	Broj uzorka							
	20	21	22	5544	5582	5581	5538	\bar{x}
Kafeinska kiselina	/	1,17	1,71	2,82	0,12	10,11	2,91	2,69
Naringenin	/	0,26	0,43	0,54	0,07	1,14	0,5	0,42
Krizin	0,03	2,79	2,38	3,64	0,28	2,24	2,36	1,96
Pinocembrin	0,06	2,48	5,46	3,33	0,03	6,14	2,58	2,87
Galangin	0,02	1,66	3,07	1,44	0,01	1,22	0,68	1,16
Ukupni flavonoidi	0,11	7,18	1,13	8,95	0,14	10,74	6,12	4,91
Ukupni polifenoli	0,11	8,74	16,79	12,6	0,13	15,72	9,03	9,02

Izvor: Kosalec i sur. (2003)

U istraživanju objavljenom 2020. proučavan je kemijski sastav, između ostalog i udio fenola i flavonoida te antioksidacijska aktivnost propolisa prikupljenog na pojedinim hrvatskim otocima. Uzorci su pripremljeni otapanjem propolisa u alkoholu te su analizirani Folin-Ciocalteu metodom kako bi se odredio udio fenola. Ukupni udio fenola kretao se između 14 i 189,7 mg galne kiseline/g dok je ukupni udio flavonoida iznosio 7,2-103,9 mg kvarcetina/g propolisa. U tablici 2.1.3.3. prikazani su rezultati istraživanja.

Tablica 2.1.3.3. Udio fenola, flavonoida te antioksidacijska aktivnost propolisa s hrvatskih otoka

Uzorak	Udio fenola		Udio flavonoida		DPPH		FRAP	
	mg GAE/g	±SD	mg QE/g	±SD	mg GAE/g	±SD	mmol Fe ²⁺ /g	±SD
Biševo	14	0,9	8,8	0,1	2,6	0,1	0,1	0
Korčula	15,9	0,9	11,1	0,3	2,7	0,1	0,2	0
Rab	189,7	1,5	103,9	4,2	81,6	5,2	0,8	0
Pag	22,5	1,2	11,1	0,2	6,3	0,2	0,3	0
Krk (Omišalj)	36,7	1,8	14,9	0,3	31,8	2,2	0,5	0,1
Krk (Pinezići)	33,2	0,3	7,2	0,4	11,2	0,2	0,4	0
Krk (Draga Bašćanska)	26,1	0,8	18	0,6	12,7	0,4	0,4	0

Ukupni udio fenola izražen je kao udio galne kiseline (GAE), ukupni udio flavonoida izražen je kao udio kvarcetina (QE), a antioksidativna aktivnost izražena je kao udio galne kiseline (DPPH) i kao milimolarna koncentracija Fe²⁺ (FRAP)

Izvor: Svečnjak i sur. (2020)

Najčešći polifenoli u sastavu propolisa su pinocembrin, kafeinska kiselina, cinaminska kiselina, kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, artepilin C, krizin, galangin, kempferol i kvarcetin ali zastupljenost pojedinih spojeva u propolisu ovisi o geografskom području, botaničkom podrijetlu propolisa i vremenu u godini. Pinocembrin je jedan od spojeva u sastavu propolisa kojeg odlikuje antibakterijski učinak i to između ostalog kod vrsta: *E. faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cryptococcus neoformans* i *Candida albicans*. Pinocembrin djeluje antibakterijski na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Tablica 2.1.3.4. prikazuje kemijski sastav propolisa čiji su uzorci prikupljeni u Maleziji, a čiji je značajan sastojak pinocembrin. U tablici su vidljivi udjeli pojedinih kemijskih spojeva u sastavu propolisa koji je pripremljen u dva oblika: ekstrakt propolisa u etanolu i ekstrakt propolisa u etil acetatu.

Tablica 2.1.3.4. Kemijski sastav Malezijskog propolisa

	Ekstrakt propolisa u etanolu	Ekstrakt propolisa u etil acetatu
Kafeinska kiselina	-	-
Rutin	-	-
Kvercetin	1,43	1,39
Cinaminska kiselina	-	-
Luteolin	0,61	0,51
Kempferol	5,88	5,62
Apigenin	1,22	1,12
Pinocembrin	5,64	4,06

Udio pojedinih sastojaka izražen je u µg/mL

Izvor: Hwa Ong i sur. (2017)

Rezultati su analizirani HPLC metodom, a u tablici je vidljiv veći udio svih kemijskih spojeva u ekstraktu propolisa u etanolu u usporedbi s ekstraktom propolisa u etil acetatu što može biti uzrok veće polarnosti etanola (Hwa Ong i sur., 2017).

Različiti uzorci propolisa s područja Meksika su prikupljeni i analiziran je njihov sastav odnosno udio polifenola u alkoholnoj tinkturi. Rezultati su pokazali velike oscilacije u udjelu polifenola pa je tako on iznosio između 6,8 i 50,1 % (Hernández Zarate i sur., 2018). Isti autori navode da i ostala istraživanja imaju velika variranja u udjelu polifenola u propolisu i to od 4,29 do 32,9 % u Kini, Makedoniji i Portugalu, maksimalno 29,8 % u Argentini, Australiji, Brazilu, Bugarskoj i Čileu, a u Indiji manje od 16 %. Međutim Galeotti i sur. (2018) navode kako su različiti pripravci propolisa (prah, alkoholno-vodena otopina, ekstrakt s uljem, glikolni ekstrakt i glicerinski ekstrakt) imali različit udio polifenola, ali su svi imali podjednak antioksidativni učinak.

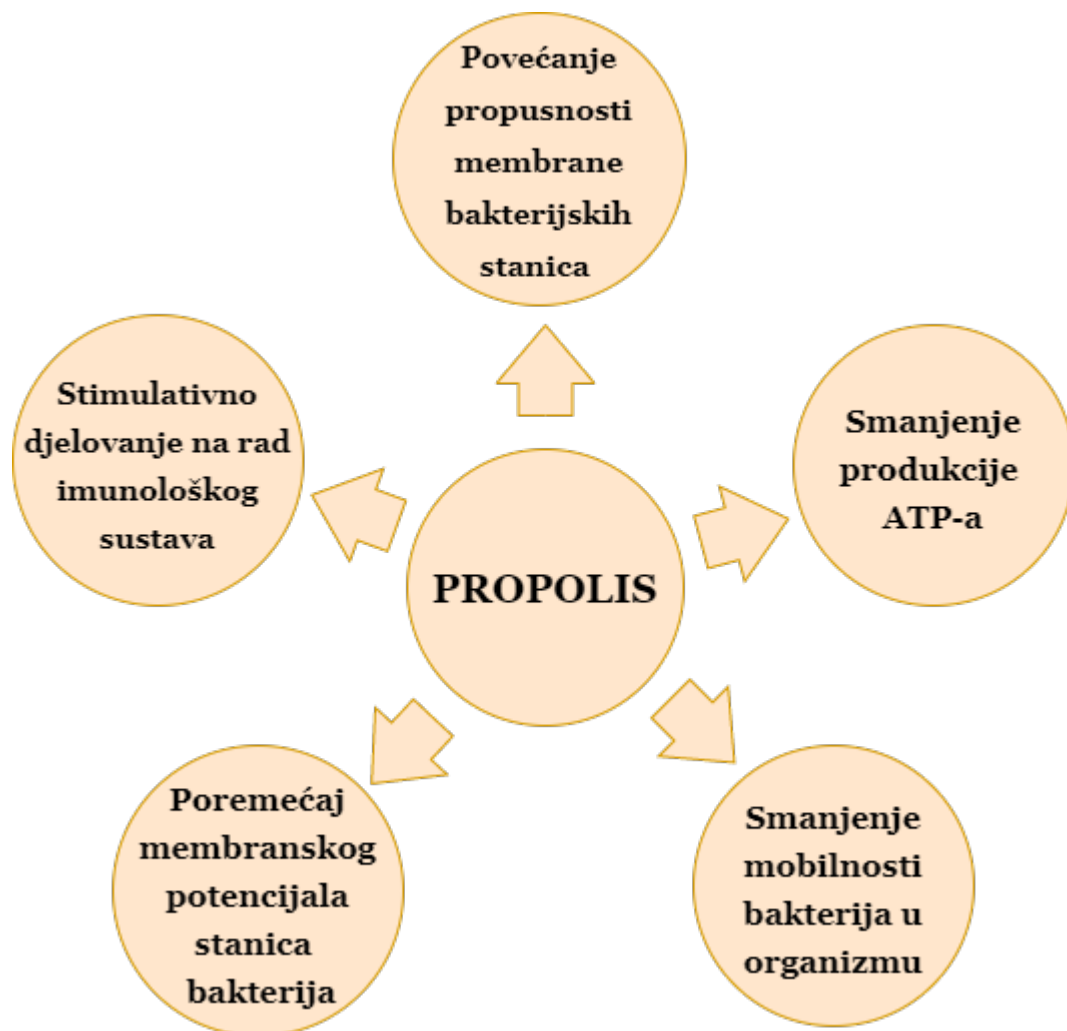
Kako je već prethodno navedeno, sastav propolisa ovisi o njegovom botaničkom podrijetlu, vremenu u godini, geografskom položaju gdje je skupljen itd. Zbog toga udio polifenola nije uvijek isti već se značajno razlikuje pa tako u raznim istraživanjima postoje različiti podaci. Uzrok različitosti podataka leži i u činjenici da su u istraživanjima korištene različite metode analize i različiti pripravci propolisa.

2.2.4. Upotreba i antiseptička svojstva propolisa

Kroz povijest su razni autori opisivali upotrebu propolisa u medicinske svrhe pa ga tako Aristotel opisuje kao sredstvo za liječenje modrica i čireva, rimski učenjak Plinije navodi da smanjuje oticanje i ublažava bol, a Nicholas Culpepper 1653. godine ističe da propolis liječi bilo kakve upale. Osim u medicini propolis su drevni Egipćani koristili kao lijepilo, proizvođači violina, obitelji Stradivari, Amati i drugi su propolisom lakirali violine, a stari Grci su ga koristili u proizvodnji parfema (Bogdanov i Bankova, 2016).

Uzorci propolisa iz različitih dijelova svijeta se značajno razlikuju u sastavu međutim to ne utječe na njegovo biološko djelovanje i uvijek do izražaja dolaze njegova značajna antibakterijska, antigljivična, antioksidativna i druga svojstva (Kurek-Górecka i sur. 2013).

2019. godine je objavljeno istraživanje (Przybyłek i Karpiński) koje objedinjuje veliki broj radova na temu antibakterijskog djelovanja propolisa. Istražen je utjecaj propolisa na više od 600 vrsta bakterija. Autori su zaključili da propolis ima značajno antibakterijsko djelovanje na Gram-pozitivne i na Gram-negativne bakterije ali ipak ostvaruje jače djelovanje na Gram-pozitivne bakterije, također djeluje na aerobne i anaerobne bakterije. Uzorci propolisa skupljeni na području Bliskog istoka pokazali su najveće, a oni iz Njemačke, Irske i Koreje najmanje antibakterijsko djelovanje. Propolis između ostalog ima značajno djelovanje na bakteriju *Escherichia coli* kojoj je posvećeno najviše znanstvenih radova o antibakterijskom djelovanju propolisa.



Slika 2.1.4.1. Način antibakterijskog djelovanja propolisa

Izvor: Przybyłek i Karpiński (2019)

Propolis na bakterije djeluje na dva načina. Prvi način je direktno djelovanje na stanice bakterija, a drugi se očituje u stimulativnom djelovanju na rad imunološkog sustava kao što je prikazano na slici 2.1.4.1. (Przybyłek i Karpiński, 2019).

Propolis ima fungicidna (antigljivična) svojstva za koja su zaslužni flavonoidi i ostali fenoli, a njegova fungicidna svojstva istraživana su na raznim vrstama kvasaca među kojima su vrste rodova *Saccharomyces* i *Trichosporon* koji su uzeti iz gljivične infekcije nokta (Shehu i sur., 2015). Drugo istraživanje je pratilo fungicidno djelovanje propolisa na rodove gljiva *Candida*, *Microsporum*, *Trichophyton*, *Fusarium* i ostale dermatofite (Kujumgiev i sur., 1999 prema Shehu i sur., 2015). Čak i u vrlo malim koncentracijama propolis ima fungicidno djelovanje kod pojedinih dermatofita, a njegova iznimno niska toksičnost za ljudski organizam mu omogućuje široku i svakodnevnu upotrebu (Shehu i sur., 2015). Propolis fungicidno djeluje na mnoge vrste površinskih gljivica koje uzrokuju kožne bolesti nogu: psorijaza, alopecija, neurodermatitis itd. (Ernješ, 2017).

Zbog nedostatka antioksidansa koji neutraliziraju slobodne radikale može doći do razvoja bolesti kao što su rak, upale, neurodegenerativne i kardiovaskularne bolesti. U prehrambenoj industriji se danas koriste sintetički antioksidansi kao što su butilhidroksitoluen (BHT, E321) i butilhidroksianizol (BHA, E320) međutim sintetički antioksidansi se povezuju s oštećenjima jetre i razvojem stanica raka (Ristivojević, 2014). Propolis se koristi kao dodatak prehrani jer je prirodni izvor antioksidansa (Galeotti i sur., 2018). Sastojci propolisa odgovorni za antioksidativnu aktivnost su fenoli (Kocot i sur., 2018). Nedavno je provedeno istraživanje u Čileu (Kocot i sur., 2018) u kojem su ispitanici dva puta dnevno, 90 dana uzimali po 15 kapi propolisa u obliku preparata Beepolis®. Cilj istraživanja je bio utvrditi utjecaj i antioksidativno djelovanje propolisa kod metabolizma lipida. Rezultati su pokazali smanjenje štetnih derivata peroksidacije lipida za 67 % te povećanje korisnog reduciranog glutationa za 175 %. 2004. godine je provedeno istraživanje o antioksidativnim svojstvima propolisa čiji su uzorci prikupljeni širom svijeta. Uzorci su ispitivani u alkoholnoj tinkturi propolisa. Najveću antioksidativnu aktivnost imali su uzorci propolisa iz Argentine, Australije, Kine, Mađarske i Novog Zelanda, a navedeni uzorci su također imali i najveći udio polifenola i flavonoida što jasno dokazuje da su upravo polifenoli zaslužni za antioksidativni učinak propolisa (Kumazawa i sur., 2004).

Antitumorna svojstva propolisa se očituju u antioksidacijskoj aktivnosti propolisa ali i u direktnom djelovanju na stanice raka, a za to su zaslužni pojedini polifenoli u sastavu propolisa. Fenetil ester kafeinske kiseline (CAPE) i krizin mogu inhibirati stanični ciklus odnosno zaustaviti umnažanje stanica raka. Također mogu uzrokovati apoptozu stanica raka. Autori istraživanja navode kako propolis odnosno pojedini njegovi sastojci posjeduju antitumorna svojstva i imaju potencijala za primjenu u sastavu lijekova protiv raka (Sawicka, 2012).

U prethodnom poglavlju su navedene brojne zdravstvene prednosti polifenola, a budući da propolis sadrži značajan udio polifenola, iste se mogu povezati i s upotrebom propolisa.

Propolis se može koristiti u obliku tinktura (alkoholne i bezalkoholne otopine), tableta, sirupa, vodenih ekstrakata i masti no najčešće je prisutan u obliku alkoholne tinkture za koju se koristi etilni alkohol. Tinktura se priprema na način da se sirovi propolis prelije alkoholom i zatvori u boci te se drži u uvjetima bez svjetla. Potrebno je povremeno miješanje, a nakon toga se filtrira kako bi se odvojili neotopljeni dijelovi. Na kraju se dobije alkoholni ekstrakt propolisa koji se koristi za premazivanje rana, oštećenja kože, upale grla i u dentalne svrhe. Dnevno se preporuča 12 do 20 kapi (Ernješ, 2017). Propolis se najbolje otapa u 70 i 95 %-tnom etanolu, može se otapati i u slabijim koncentracijama ali uz manje rezultate. Propolis se može koristiti i u raznim drugim pripravcima kao što su mješavine s medom, u kremama, pastama itd. U obliku alkoholne tinkture propolis ima rok trajanja od 3 godine, u mješavini s medom dvije godine, a sirovi propolis može stajati i više godina u zamrzivaču. Prema nekim izvorima propolis u obliku alkoholne tinkture je i nakon 15 godina zadržao antimikrobna svojstva što ga čini izrazito stabilnim, međutim osjetljiv je na svjetlost jer dolazi do fotooksidacije pa ga je potrebno skladištiti u tamnoj ambalaži (Bogdanov i Bankova, 2016).

Slika 2.1.4.2. prikazuje propolis koji se otapa u 96 %-tnom etilnom alkoholu. Vidljivo je slijevanje krutih sastojaka na dno zbog čega je potrebno miješanje.



Slika 2.1.4.2. Priprema tinkture propolisa

Propolis se mora čuvati u tamnim bočicama i dalje od izvora svjetla kako svjetlost ne bi utjecala na njegova svojstva, također preporuča se čuvanje dalje od izvora topline. Način čuvanja i snažan gorak okus koji je karakterističan za propolis ograničavaju njegovu primjenu i korištenje. Stoga treba obratiti pozornost na druge načine primjene propolisa, a jedan od njih je inkapsulirani propolis.

3. Tehnike inkapsulacije propolisa

Inkapsulacija je postupak u kojem nastaju male čestice (mikrokapsule) koje su građene od aktivnog sastojka i tvari koja ga okružuje (omotač). Aktivni sastojak je izoliran pomoću omotača i nalazi se u matriksu ili u središtu kapsule. Svrha inkapsulacije je stabilizacija aktivnog sastojka, sprječavanje oksidacije, kontrolirano otpuštanje aktivnog sastojka, maskiranje njegovog okusa, boje ili mirisa, produljenje njegovog vijeka trajanja, očuvanje nutritivnih vrijednosti i zaštita od okolišnih čimbenika kao što su svjetlost, kisik i promjena pH vrijednosti (Silva i Meireles, 2014). Kao omotač se koriste biorazgradivi polimeri, a tu ulogu preuzimaju pojedini ugljikohidrati, lipidi i proteini zbog mogućnosti sigurne primjene u medicini, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Vinceković i sur., 2017; Fathi i sur., 2019; Jurić i sur., 2020). Pojedini aktivni sastojci kao što su vitamini, antioksidansi, karotenoidi i prirodni antibiotici imaju veliki potencijal u primjeni u inkapsuliranom obliku jer se tako održava njihova stabilnost, probavljivost i biodostupnost te valja istaknuti mogućnost oslobađanja aktivnog sastojka u ciljanim tkivima organizma (Nascimento i sur., 2019).

Inkapsulacija polifenola se provodi kako bi se očuvala njihova stabilnost, produljio vijek trajanja i kako bi se zaštitili od vanjskih utjecaja. Također inkapsulacijom se pokušava riješiti problem slabe dostupnosti polifenola kako bi se zadovoljila njihova sve veća potražnja i učinkovitost u kozmetici i prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Munin i Edwards-Lévy, 2011). Sredstvo koje se najčešće koristi kao omotač je alginat, prirodni polimer dobiven od smeđih morskih algi. Odlikuje ga velika prisutnost u prirodi, biokompatibilnost i niska cijena što ga čini iznimno zanimljivim proizvodom za korištenje u prehrambenoj industriji. Osim za inkapsulaciju koristi se i kao zgušnjivač i sredstvo za emulgiranje (Blažanin, 2015).

Propolis je zanimljiv za inkapsulaciju upravo zbog svojih svojstava osjetljivosti na svjetlost i izrazito gorkog okusa. Primjenom propolisa u inkapsuliranom obliku moglo bi se pojednostavniti njegovo čuvanje i raširiti njegova primjena zbog maskiranja gorkog okusa.

Postoje brojne metode inkapsulacije i sve imaju cilj dobivanja čestica određene veličine s aktivnim sastojkom koji je izoliran omotačem. U ovom radu dan je pregled nekih metoda inkapsulacije koje imaju mogućnost primjene kod inkapsulacije polifenolnih spojeva.

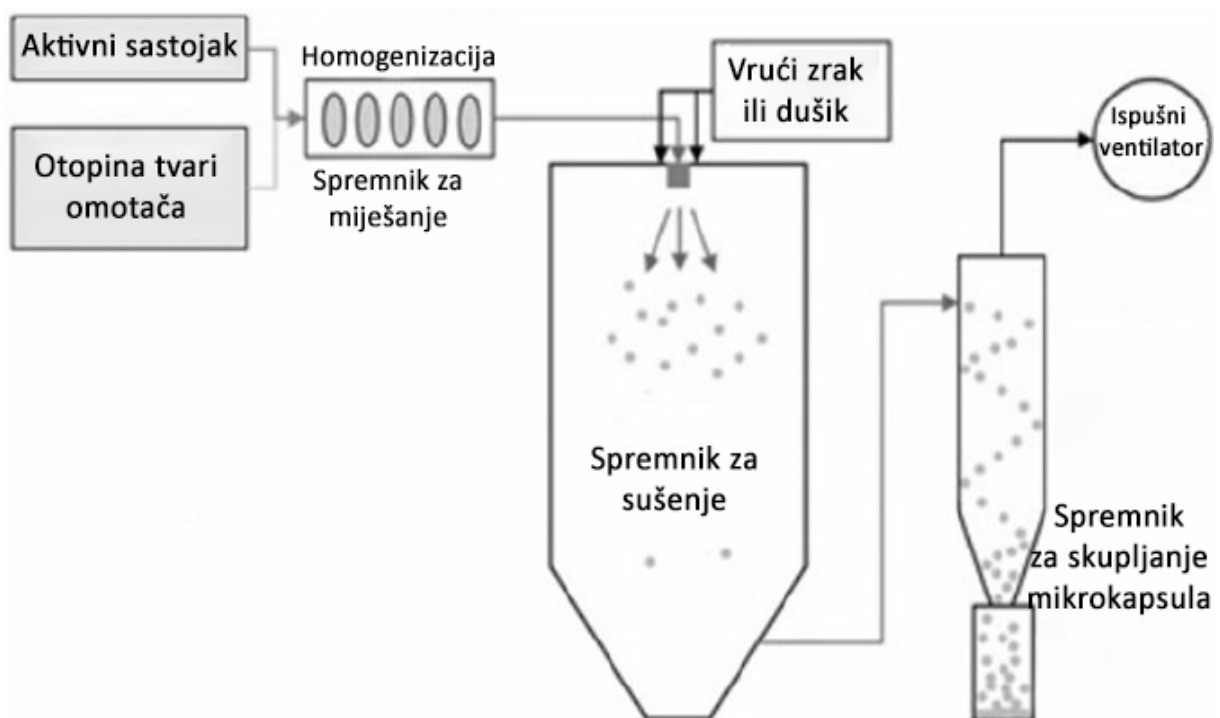
3.1. Fizikalne metode

3.1.1. Sušenje raspršivanjem (*Spray-Drying*)

Sušenje raspršivanjem je postupak sušenja u kojem materijal prelazi iz tekućeg u kruto stanje odnosno u oblik praha, a to se postiže raspršivanjem tekućine na veliki broj kapljica. Najznačajnija područja primjene su prehrambena i farmaceutska industrija (Jurić, 2017). Metodom sušenja raspršivanjem stvaraju se čestice koje nastaju disperzijom aktivnog sastojka u otopini omotača. Tekuća formulacija koja sadrži omotač i aktivni sastojak u otopini je raspršena u sitne kapljice pomoću mlaznice koja koristi plin ili pomoću atomizera koji koristi kotačić koji se rotira velikom brzinom. Zatim se te raspršene kapljice zagrijavaju pomoću

vrućeg zraka ili dušika što dovodi do isparavanja tekućeg dijela pa ostaje prah odnosno sitne krute čestice veličine obično 10-100 μm . Prednosti sušenja raspršivanjem su brzina odnosno kratko trajanje procesa, relativno je jeftin proces, fleksibilnost i proizvodnja visoko kvalitetnih i stabilnih čestica. Ulogu omotača najčešće imaju arapska guma, maltodekstrin, i modificirani škrob. Novonastale čestice su većinom okruglog oblika, a njihova veličina ovisi o mlaznicama (Munin i Edwards-Lévy, 2011). Materijal koji ima ulogu omotača bi trebao imati dobra svojstva emulgiranja i stvaranja filma. Osim toga poželjno je da se lako suši uz nisku viskoznost i visoku koncentraciju krutih čestica te da je kemijski inertan (Adamowicz i sur., 2015).

U znanstvenom radu iz 2019. godine Nascimento i sur. opisuju postupak inkapsulacije propolisa metodom sušenja raspršivanjem. Škrob i destilirana voda su zagrijani na 60 °C i kasnije je dodana otopina maltodekstrina i ksantan gume te je sve skupa stavljeno u miješalicu radi postizanja homogenizacije. Zatim je propolis koji je otopljen u alkoholu dodavan kako bi se oformio omotač oko propolisa. Sve skupa je izloženo desetominutnom miješanju pri velikoj brzini prije nego što je započeo proces sušenja raspršivanjem. Kapljice su raspršene pomoću zraka pod tlakom od 2,6 bara i sušene strujanjem zraka temperature 105-109 °C. Dobivene su mikrokapsule veličine od 2,58 do 35 μm glatke površine i bez pora ili pukotina. Na slici 3.1.1.1. vidljiv je shematski prikaz metode inkapsulacije sušenja raspršivanjem.



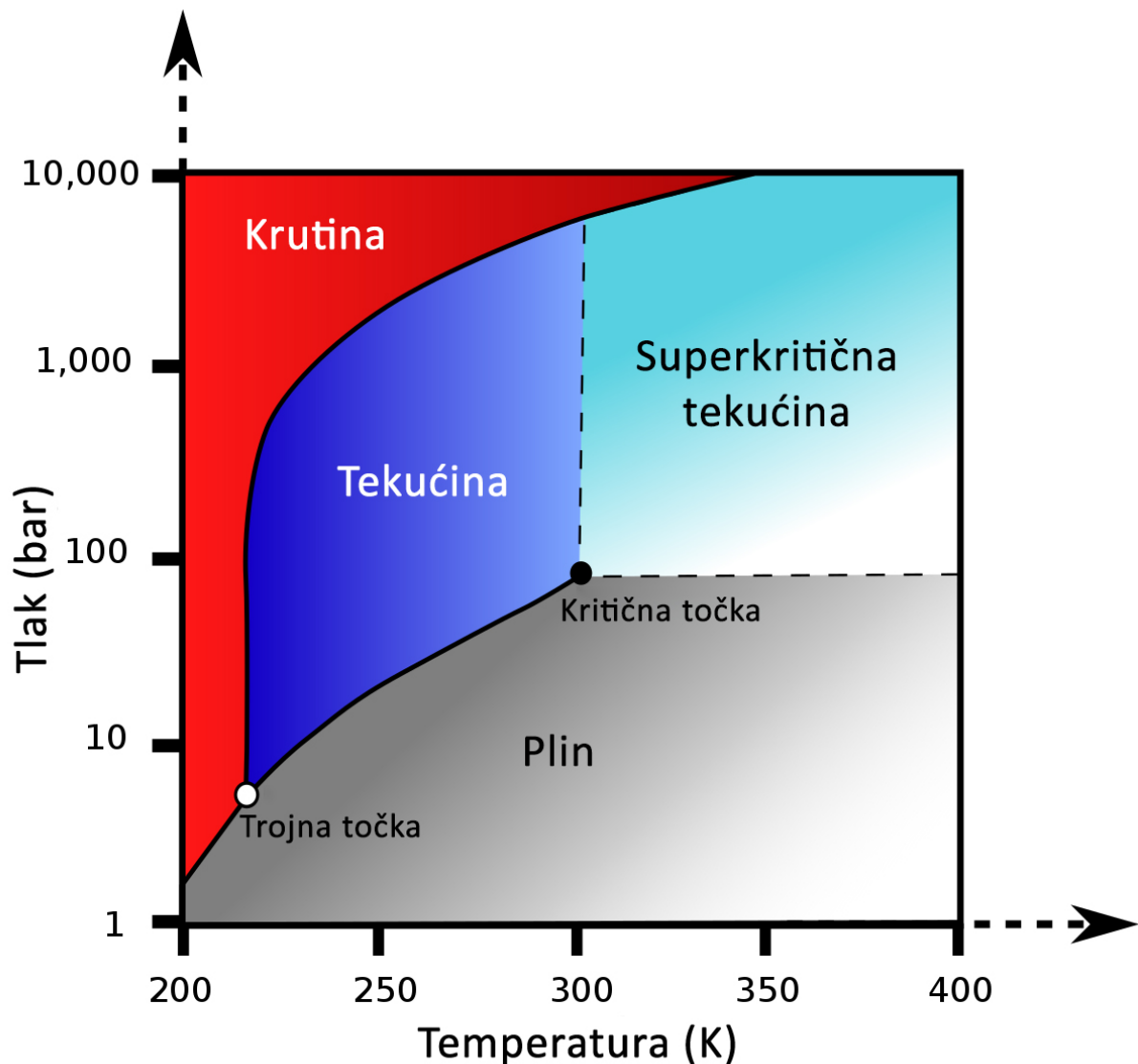
Slika 3.1.1.1. Shematski prikaz metode sušenja raspršivanjem

Izvor: Bastos i Santos, 2015

3.1.2. Proces inkapsulacije upotrebom superkritičnih tekućina

Superkritične tekućine su tvari koje se zbog uvjeta visokih temperature i tlaka, iznad njihove kritične točke nalaze u stanju između plinovitog i tekućeg. U takvim uvjetima nije

vidljiva jasna razlika između agregatnog stanja tvari, već ona ima pojedina svojstva oba stanja. Agregatno stanje tvari ovisi o uvjetima temperature i tlaka kao što je vidljivo na dijagramu (Slika 3.1.2.1.). Za svako stanje moguć je velik broj različitih kombinacija tlaka i temperature, međutim samo je jedna kombinacija tlaka i temperature pri kojoj je tvar u sva tri agregatna stanja istovremeno i to je trojna točka. Krivulja isparavanja spaja trojnu i kritičnu točku, a iznad kritične točke tvar se nalazi u stanju između tekućeg i plinovitog (Joshi, 2015). Ugljikov dioksid je najčešće korištena superkritična tekućina zbog svoje relativno niske kritične temperature i tlaka, zbog čega je povoljan za rad s tvarima osjetljivim na visoku temperaturu, ali i zbog svoje netoksičnosti, zbog niske cijene i nemogućnosti gorenja (Munin i Edwards-Lévy, 2011).



Slika 3.1.2.1. Dijagram tlaka i temperature ugljikovog dioksida

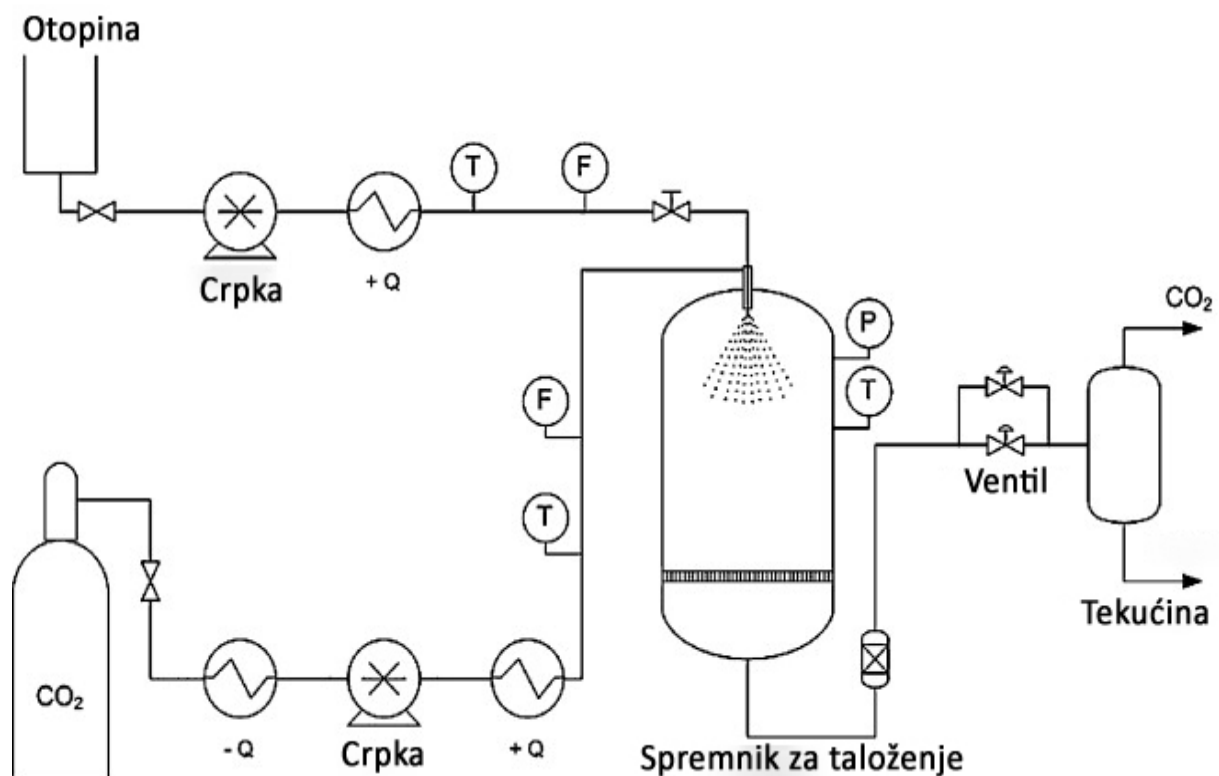
Izvor: Joshi, 2015

Munin i Edwards-Lévy (2011) navode kako postoje tri vrste procesa inkapsulacije superkritičnim tekućinama, a to su: *Rapid Expansion of Supercritical Solutions* (RESS) i slični

procesu, *Supercritical Antisolvent Processing* ili Superkrična antisolventna obrada i slični procesi te *Gas Saturated Solutions Process* i slični procesi.

3.1.2.1. Superkrična metoda protuotapalom

Kada je aktivni sastojak slabo topljiv u superkričnoj tekućini, ona se može koristiti kao antisolvent ili protuotapalo. Superkrična tekućina ili superkrično protuotapalo se ubrizga u spremnik pod tlakom koji sadrži otopinu (organsko otapalo i aktivni sastojak). Spremnik za taloženje se djelomično napuni s otopinom, dok se superkrična tekućina dovede do željenog tlaka, zatim se dodaje u spremnik. Prilikom dodira s otopinom superkrično protuotapalo se otapa smanjujući svoju gustoću i topljivu moć organskog otapala. Istovremeno, otapalo ispari što uzrokuje prezasićenost otopine, te zatim taloženje aktivnog sastojka. Nakon formiranja čestica višak otapala se uklanja kontinuiranim tokom superkrične tekućine kroz vrata za pročišćavanje. Veličina čestica nastalih ovom metodom je relativno heterogena (Munin i Edwards-Lévy, 2011). Na slici 3.1.2.1. vidljiv je shematski prikaz superkrične antisolventne obrade.



Slika 3.1.2.1. Shematski prikaz superkrične antisolventne obrade

Izvor: Munin i Edwards-Lévy, 2011

Ovom metodom moguće je primjerice izdvojiti flavonoide i druge korisne spojeve iz tinkture propolisa. U procesu ekstrakcije koristi se superkrični ugljikov dioksid koji odvaja

flavonoide kao primarni produkt i esencijalna ulja i etanol kao sekundarne produkte (Catchpole i sur., 2004).

3.1.2.2. Čestice nastale procesiranjem otopinama zasićenim plinovima

U ovoj metodi inkapsulacije superkrična tekućina ima ulogu otopljene tvari jer pod određenim tlakom plinovi prelaze u tekuće stanje. U postupku se velike količine superkrične tekućine otapaju formirajući pritom zasićenu otopinu koja sadrži i aktivni sastojak i čije je zasićenje uzrokovano prelaskom superkrične tekućine iz plinovitog u tekuće stanje. Takva otopina je zatim pomoću mlaznice raspršena u poseban spremnik gdje se formiraju krute čestice ili kapljice. Zatim, u uvjetima hlađenja i povećanja volumena plina, započinje taloženje čestica koje se pakuje nakon stabilizacije tlaka (Munin i Edwards-Lévy, 2011).

3.2. Fizikalno kemijske metode

3.2.1. Inkapsulacija hlađenjem emulzija

Kod inkapsulacije hlađenjem emulzija najprije se aktivni sastojak otopi ili rasprši u otopini koja sadrži tvar koja će kasnije imati ulogu omotača, a zatim se sve zajedno zagrijava na temperaturu višu od točke tališta tvari omotača kako bi se dobila emulzija. Nakon zagrijavanja čitava otopina se naglo hladi, a čestice prelaze u kruto stanje. Ova metoda omogućuje mikroinkapsulaciju hidrofилnih ili lipofilnih čestica ako te molekule nemaju dovoljno jak kemijski afinitet prema emulziji. Kod inkapsulacije hlađenjem emulzija se obično kao omotač koriste lipidi, primjerice karnauba vosak, zbog svoje niske točke tališta. Sličan proces se koristi za proizvodnju krutih hidrogelova, primjerice želatine, glukana ili agaroze, koji se dobivaju naglim hlađenjem hidrofилnih polimera (Munin i Edwards-Lévy, 2011).

3.2.2. Emulgiranje - metoda uklanjanjem otapala

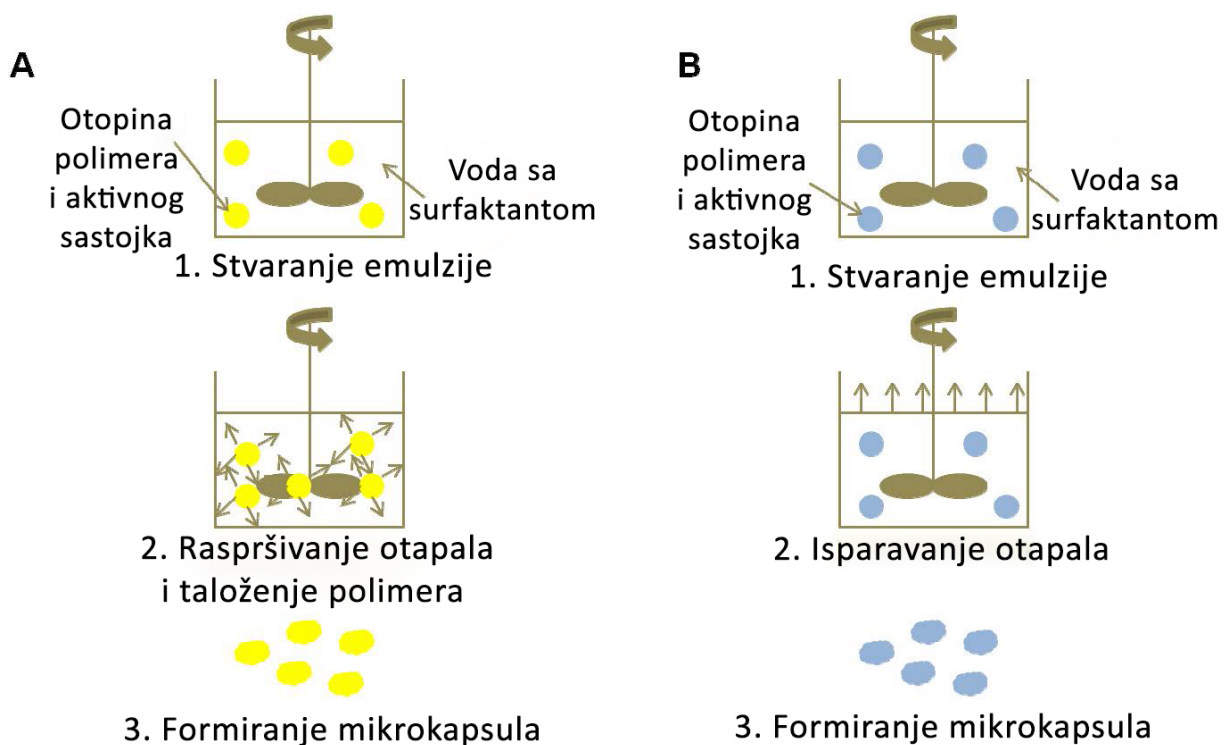
Ova metoda temelji se na isparavanju ili izdvajanju sitnih čestica iz emulzije što uzrokuje taloženje čestica polimera koji imaju ulogu omotača mikrokapsula. Sama metoda ima dvije varijante, u jednoj dolazi do isparavanja otapala, a u drugoj do ekstrakcije otapala. Kod obje varijante polimer omotač je najprije otopljen u organskom otapalu.

U varijanti isparavanja otapala odabrano je hlapljivo otapalo vrlo niske sposobnosti miješanja s vodom, poput diklormetana. Zatim se aktivni sastojak otapa ili raspršuje u polimerskoj otopini. Smjesa je vrlo fino emulgirana (pomoću ultrazvuka ili homogenizatora) u velikoj količini vode koja sadrži površinski aktivne tvari (surfaktante) kako bi se dobila emulzija s efektom ulje-u-vodi (O/W). Isparavanje otapala je postignuto zagrijavanjem i/ili u uvjetima vakuuma i uz blago miješanje. Ovaj proces nije preporučan za inkapsulaciju hlapljivih spojeva ili molekula koje imaju jaču sklonost prema kontinuiranoj fazi. Ova metoda se može primijeniti za pripremu mikročestica i nanočestica.

U varijanti ekstrakcije otapala, poznatoj kao i nanotaloženje, otapalo mora imati svojstvo sposobnosti miješanja s vodom u svim omjerima. Polimerska otopina koja sadrži aktivni sastojak je dodana tijekom mućkanja u vodenu otopinu koja sadrži surfaktant. Nanočestice se formiraju spontanim raspršivanjem otapala u vodenoj fazi: polimer, netopljiv u smjesi vode i otapala, se taloži stvarajući nanočestice i zarobljujući aktivni sastojak.

Nakon uklanjanja otapala čestice se peru i izdvoje filtracijom ili centrifugom te se zatim suše ili liofiliziraju (Munin i Edwards-Lévy, 2011).

Slika 3.2.2.1. prikazuje dvije varijante emulgiranja, metode inkapsulacije uklanjanjem otapala: varijanta ekstrakcije otapala (A) i varijanta isparavanja otapala (B)



Slika 3.2.2.1. varijanta ekstrakcije otapala (A) i varijanta isparavanja otapala (B)

Izvor: Munin i Edwards-Lévy, 2011

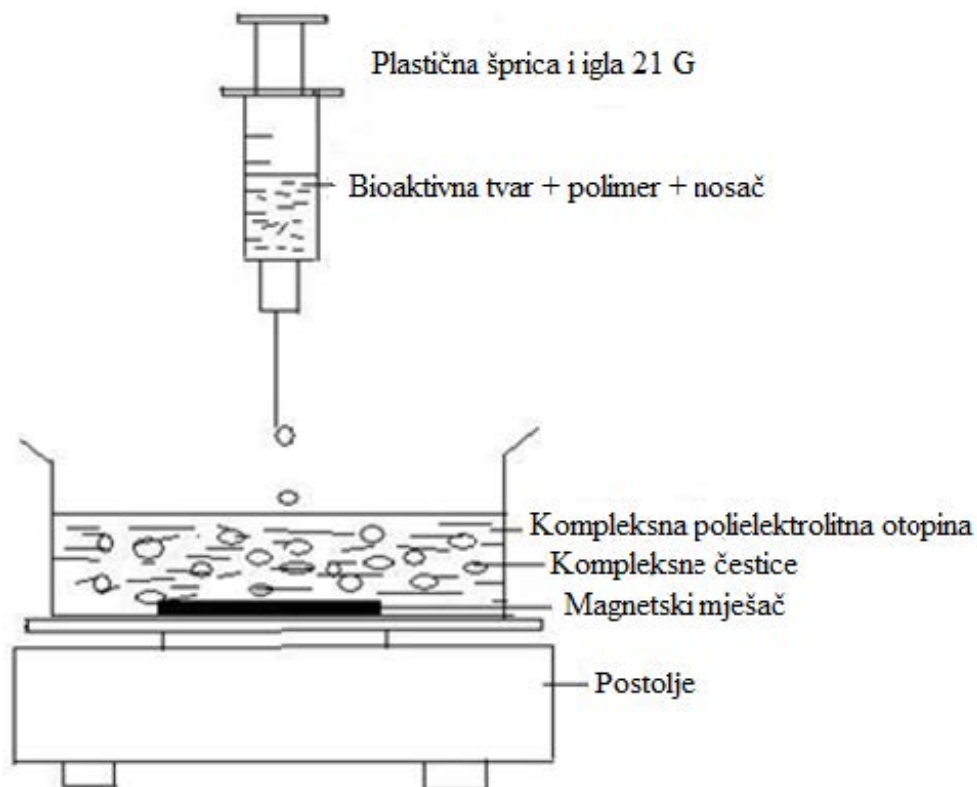
De Mélo Silva i sur. (2019) inkapsulirali su propolis metodom emulgiranja s uklanjanjem otapala uz male izmjene. Najprije je polimer PLGA (*poly(lactic-co-glycolic acid)*) ili poli-mliječna-Co-glikolna kiselina) otopljena u diklormetanu te je dodan hidroetanolni ekstrakt propolisa. Dobivena organska otopina je uz miješanje dodana u vodenu otopinu polivinil alkohola. Sve zajedno je zatim podvrgnuto ultrazvuku kako bi došlo do stvaranja emulzije. Zatim je emulzija miješana pri sobnoj temperaturi 12 sati kako bi diklormetan ispario, a nakon toga je uslijedila centrifuga kako bi se izdvojile nanokapsule. Dobivene su čestice glatke površine i sfernog oblika, veličine između 312 ± 57 i 224 ± 19 nm. Zbog nanometarskih veličina dobivene čestice nazivaju se nanokapsule.

3.3. Metode temeljene na ionskim interakcijama

3.3.1. Ionsko geliranje

Ionsko geliranje jednostavna je metoda koja se temelji na elektrostatskim interakcijama. Kao omotači se koriste polisaharidi kao što su alginat, gelan guma, kitozan, pektin i karboksimetil celuloza. Najprije se polisaharidi koji služe kao omotač otape u vodi ili nekom blago kiselom otapalu zajedno s aktivnim sastojkom, a zatim se ta otopina polisaharida u obliku kapljica dodaje uz stalno miješanje u otopinu u kojoj se nalaze ioni, najčešće kationi suprotnog naboja. Zbog interakcije suprotno nabijenih čestica, polisaharidi formiraju gel te se talože u obliku kuglica gela. Te se kuglice izdvajaju filtracijom i ispiru destiliranom vodom te se potom suše (Blažanin, 2015). Na slici 3.3.1.1. prikazana je metoda inkapsulacije ionskim geliranjem.

Vugrinec (2018) navodi kako na veličinu i oblik čestica nastalih ionskim geliranjem utječu koncentracija polimera i otopine iona, temperatura, pH otopine za geliranje i koncentracija otopine aktivnog sastojka. Ionsko geliranje nije pretjerano pogodno za inkapsulaciju hidrofилnih ili niskomolekulskih tvari zbog brze difuzije kroz omotač.



Slika 3.3.1.1. Ionsko geliranje

Izvor: Blažanin, 2015

Hwa Ong i sur. su 2017. godine proveli istraživanje koje je uključivalo inkapsulaciju propolisa ionskim geliranjem. Korištena je 20-postotni alkoholna tinktura propolisa kao aktivni

sastojak i hitozan kao omotač. Hitozan je otopljen u ledenoj octenoj kiselini te je otopina filtrirana i kasnije je dodan ekstrakt propolisa uz emulgator polisorbant 80. Dobivene su otopine s različitim udjelima propolisa i hitozana. Otopina natrijevog tripolifosfata u deioniziranoj vodi je imala ulogu ionske otopine te je dodavana u obliku kapljica u otopinu hitozana i propolisa uz stalno miješanje. Iz dobivene otopine su nanočestice izdvojene u obliku sedimenta nakon ultracentrifugiranja od 20 minuta.

Sličan postupak opisuju i Keskin i sur. (2019), natrijev alginat je korišten kao omotač i najprije je rastopljen u etanolu te je dodan propolis. Nakon što je smjesa homogenizirana dodavana je kap po kap u otopinu kalcijeva klorida uz konstantno miješanje. Na kraju je smjesa filtrirana te su izdvojene kapsule posušene.

3.3.2. Kompleksna koacervacija

Kompleksna koacervacija temelji se na interakciji suprotno nabijenih polimera i za razliku od jednostavne koacervacije u kojoj sudjeluje jedan polimer u kompleksnoj koacervaciji sudjeluju dva različita polimera. U toj metodi inkapsulacije otopina koja sadrži aktivni sastojak i polimere se razdvaja na dva dijela zbog djelovanja suprotnog naboja. Nastaju dvije tekuće faze koje se ne mogu miješati i pri čijem nastanku dolazi do udruživanja suprotno nabijenih iona oko aktivnog sastojka. Polimeri koji se najčešće koriste u kompleksnoj koacervaciji su želatina i arapska guma jer su biorazgradivi i dostupni. Naboj želatine ovisi o pH vrijednosti, a najčešće se koristi kao negativno nabijena. U tom slučaju arapska guma se koristi kao pozitivno nabijena. Za proces kompleksne koacervacije važno je precizno podesiti sve parametre jer i mala odstupanja mogu drastično utjecati na stvaranje mikrokapsula. Po potrebi se dodaje i surfaktant u otopinu arapske gume, zatim se podešava pH vrijednost na 6,5, a nakon toga slijedi zagrijavanje na 45 °C. Kako bi se dobila emulzija, u otopinu arapske gume se dodaje parafin uz miješanje, a zatim slijedi dodavanje želatine kapanjem, a pH se podešava na 4,5 radi poticanja koacervacije. Nakon jednosatnog miješanja čitava smjesa se podlaže centrifugiranju te se na površini i na dnu dobiju koacervati. Na kraju slijedi sušenje (Ličanin, 2016). Kompleksna koacervacija se obično koristi za inkapsuliranje tvari koje imaju hidrofobna svojstva. Mikrokapsule dobivene ovom metodom inkapsulacije karakterizira dobro kontrolirano otpuštanje i otpornost na toplinu. S obzirom da se ne odvija pri visokim temperaturama, kompleksna koacervacija je metoda pogodna za inkapsulaciju termolabilnih spojeva (Adamowicz i sur., 2015).

Pozippe Nori i sur. (2011) su inkapsulirali alkoholnu tinkturu propolisa kompleksnom koacervacijom. Najprije je pripremljena vodena otopina sojinog proteina (pH 8.0 dobiven s NaOH), a zatim je u otopinu dodan ekstrakt propolisa. Smjesa je homogenizirana te je u nju polako dodavana otopina pektina uz snižavanje pH vrijednosti na 5.0, 4.5, 4.0 i 3.5 pomoću klorovodične kiseline uz stalno miješanje i pri temperaturi od 40 °C. Po završetku procesa smjesa je ohlađena i ostavljena da se slegne. Nakon što je izdvojen sediment, isti je smrznut na -18 °C i liofiliziran. Dobivene mikrokapsule bile su okruglog oblika i veličine 10 do 90 µm.

Kompleksna koacervacija propolisa moguća je i korištenjem želatine i arapske gume (İnşaatç i Yaman Turan, 2018). Postupak je sličan, u vodenu otopinu želatine dodana je otopina propolisa i ulja, a nakon homogenizacije je dodavana vodena otopina arapske gume. Na kraju se mikrokapsule odvajaju i suše. Veličina dobivenih mikrokapsula bila je 15 do 387 μm .

3.4. Kemijske metode

3.4.1. *In Situ* polimerizacija

Polimerizacija je kemijska reakcija u kojoj se veći broj monomera povezuje kovalentnim vezama u polimere, a može se provesti u masi, otopini, emulziji, suspenziji, plinskoj fazi (Hrvatska enciklopedija, 2020).

In Situ polimerizacija je metoda inkapsulacije koja se uglavnom koristi za sintezu nanokompozita. Nanokompoziti su novi materijali (hibridi) u kojima komponente ili strukture nanometarskih dimenzija pridonose istinski novim svojstvima koja ne posjeduju klasični kompoziti ili čiste komponente (Ivanković, 2007). Kod *In Situ* polimerizacije najprije se monomerske komponente (npr. stiren ili metil) otope u vodi te emulgiraju pomoću surfaktanta. Zatim započinje polimerizacija te se stvaraju nanočestice (Munin i Edwards-Lévy, 2011).

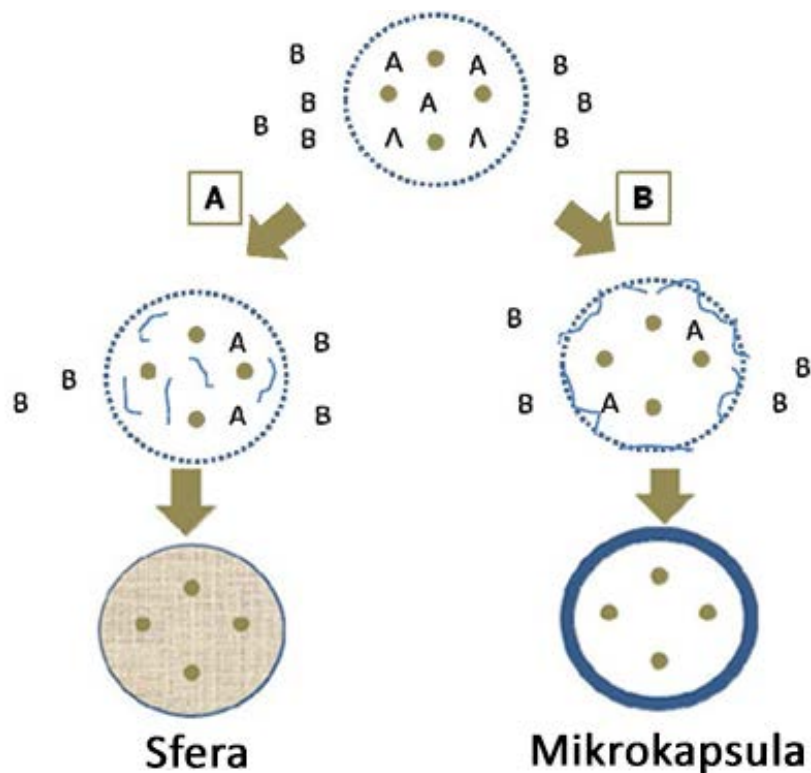
Adamowicz i sur. (2015) navode kako je *In Situ* polimerizacija proces izgradnje ovojnice kapsule polimerizacijom monomera dodavanjem istih u reaktor za inkapsuliranje. Polimerizacijom se formiraju čestice male molekulske mase. Porastom njihove molekulske mase oni se vežu na površinu aktivnog sastojka otopljenog u vodi te se na taj način stvaraju kapsule.

3.4.2. Interfacijalna polikondenzacija i umrežavanje

Interfacijalna polikondenzacija (*Interfacial Polycondensation*) je kemijska reakcija u kojoj nastaje membrana sačinjena od polimera. Ta se membrana formira oko kapljica emulzije, na mjestu dodira disperzne faze i disperznog sredstva, a temelji se na činjenici da svaka faza sadrži neki monomer. Ova metoda može se koristiti za inkapsulaciju aktivnih sastojaka topljivih u vodi ili topljivih u organskim otapalima. U slučaju inkapsulacije aktivnog sastojka topljivog u vodi najprije se formira otopina aktivnog sastojka i monomera A u destiliranoj vodi. Emulzija ulje-u-vodi (W/O) nastaje emulgiranjem vodene faze i organske faze. Zatim se dodaje monomer B koji je topljiv u organskim otapalima te započinje interfacijalna polikondenzacija između monomera A i B. U slučaju inkapsulacije aktivnog sastojka topljivog u organskim otapalima postupak je gotovo identičan. Tada nastaje emulzija voda-u-ulju (O/W). Tijekom inkapsulacije moguće su dvije situacije, prva kada je oligomer topljiv u kapljicama (Slika 3.4.2.1. A) pa nastaje polimer unutar kapljica te se formiraju mikrosfere i druga kada oligomer nije topljiv u kapljicama (Slika 3.4.2.1. B) pa se formira membrana sačinjena od polimera oko kapljica i nastaju mikrokapsule. Na karakteristike membrane i veličinu čestica utječu odabir

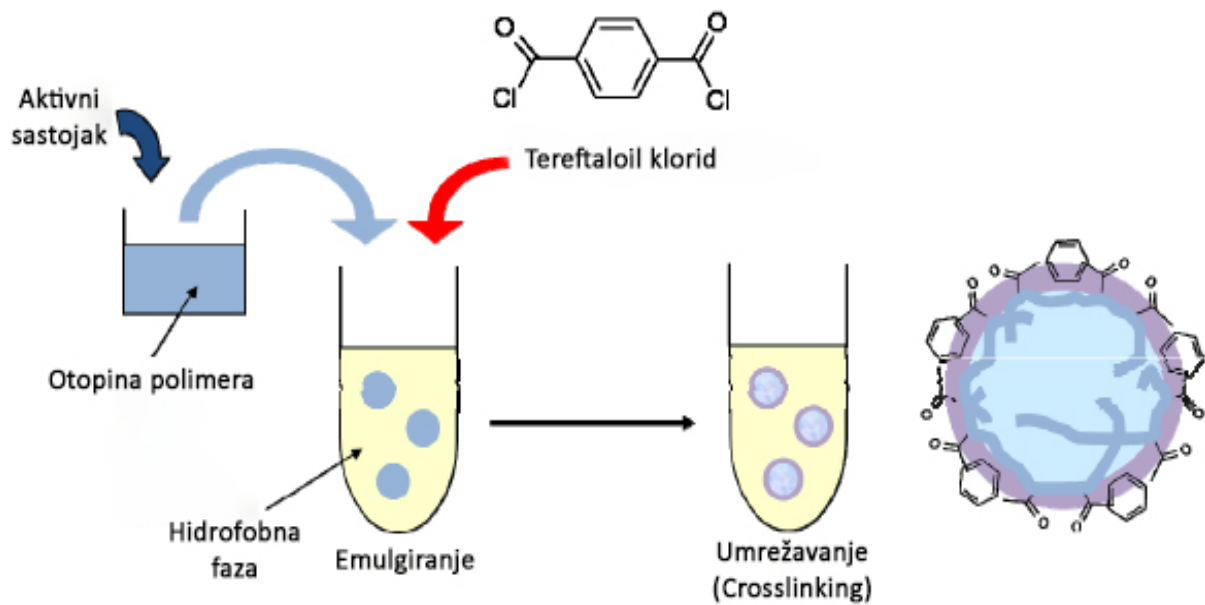
monomera, koncentracija i odabir surfaktanta, karakteristike otapala i brzina i duljina miješanja.

Umrežavanje (*cross-linking*) je proces inkapsulacije u kojem se umjesto vodotopivog monomera koriste polimeri ili oligomeri. Reakcija kondenzacije uključuje reaktivne skupine monomera topljivog u organskim otapalima i funkcionalne skupine polimera ili oligomera topljivog u vodi (Munin i Edwards-Lévy, 2011). Samo umrežavanje (*cross-linking*) je prema Oxford dictionary kemijska veza između različitih lanaca atoma koji zajedno čine polimer ili neku drugu složenu molekulu. Slike prikazuju procese inkapsulacije interfacijalnom kondenzacijom (slika 3.4.2.1.) i umrežavanjem (slika 3.4.2.2.) kod kojeg je korišten tereftaloil klorid.



Slika 3.4.2.1. Proces interfacijalne kondenzacije

Izvor: Munin i Edwards-Lévy, 2011



Slika 3.4.2.2. Proces umrežavanja (*cross-link*)

Izvor: Munin i Edwards-Lévy, 2011

4. Inkapsulirani propolis kao izvor polifenola

Mikrokapsule propolisa dobivene metodom sušenja raspršivanjem sadrže udio fenola i flavonoida sličan udjelu u alkoholnoj tinkturi propolisa. Tablica 4.1. prikazuje usporedbu udjela fenola, flavonoida i antioksidativne aktivnosti alkoholne tinkture propolisa i inkapsuliranog propolisa. Iz tablice se može iščitati da primjerice udio fenola kod alkoholne tinkture propolisa iznosi 9,58 %, a kod inkapsuliranog propolisa 9,42 %. Za niti jedan od parametara prikazanih u tablici nema statistički značajne razlike između alkoholne tinkture propolisa i inkapsuliranog propolisa (Nascimento i sur., 2019).

Tablica 4.1. Udio fenola, flavonoida i antioksidativna aktivnost tinkture i inkapsuliranog propolisa

	Alkoholna tinktura propolisa	Inkapsulirani propolis
Ukupni fenoli (%)	9,58 ± 2,23	9,42 ± 1,55
Ukupni flavonoidi (%)	3,51 ± 0,6	3,26 ± 0,1
Antioksidativna aktivnost (%)	91,07 ± 0,84	90,6 ± 1,13

Udio fenola je izražen kao postotak galne kiseline, udio flavonoida je izražen kao postotak kvercetina, a antioksidativna aktivnost izražena je kao postotak inhibicijskog kapaciteta DPHH radikala

Izvor: Nascimento i sur. (2019)

Isti autori navode kako omotač oko propolisa u mikrokapsulama štiti propolis od negativnog utjecaja topline. Također, mikrokapsule propolisa mogu kontrolirano otpustiti propolis i to primjerice nakon 12 sati pri pH vrijednosti od 6,8 što im daje potencijal primjene u farmaciji.

Temperatura sušenja kod metode inkapsulacije sušenja raspršivanjem nema značajnog utjecaja na sadržaj fenola u inkapsuliranom propolisu (da Silva i sur., 2011). Tako je pri temperaturi sušenja od 80 °C ukupni sadržaj fenola bio 21,2 ± 0,4 g galne kiseline/100 g uzorka, pri 100 °C je iznosio 20,9 ± 0,2, a pri 120 °C 20,6 ± 0,6 g galne kiseline/100 g uzorka.

Kartika Pratami i sur. (2020) inkapsulirali su propolis metodom sušenja raspršivanjem i sadržaj polifenola je varirao između 64,5547 i 307,325 mg galne kiseline/g. Autori ističu kako na sadržaj polifenola toliko ne utječe temperatura sušenja već su veliku varijabilnost sadržaja polifenola objasnili kao utjecaj interakcije aktivnog sastojka i omotača, koncentracije tvari omotača u otopini, te topljivosti tvari omotača. Autori zaključuju da inkapsulacija propolisa može očuvati njegovu antioksidativnu aktivnost i kemijske karakteristike te poboljšati njegove fizikalne karakteristike uključujući izgled i topljivost u vodi.

Pozippe Nori i sur. (2011) ističu kako je inkapsuliranjem propolisa kompleksnom koacervacijom moguće dobiti ekstrakt propolisa koji ne sadrži alkohol što je velika prednost i omogućuje mu širu primjenu. Osim toga, inkapsulirani propolis posjeduje antibakterijsku aktivnost, mogućnost kontroliranog otpuštanja u određenim uvjetima kao i antioksidativnu aktivnost koja je sačuvana nakon procesa inkapsulacije. U istom istraživanju je praćena i promjena udjela fenola u mikrokapsulama ovisno o duljini čuvanja i temperaturi čuvanja. Nakon 180 dana čuvanja pri temperaturi od 25 °C došlo je do malog pada udjela fenolnih

spojeva, a pri temperaturi od 10 °C nakon 180 dana udio fenolnih spojeva ostao je konstantan. Iz toga se može zaključiti kako mikrokapsule propolisa mogu sačuvati sadržaj fenolnih spojeva te uz ostale prednosti imaju potencijal primjene kao dodatak prehrani.

Keskin i sur. (2019) inkapsulirali su propolis metodom ionskog geliranja. U tom istraživanju praćen je sadržaj polifenola, flavonoida, tanina i balzamskih tvari u alkoholnoj tinkturi propolisa i inkapsuliranom propolisu. Tablica 4.2. prikazuje dobivene rezultate.

Tablica 4.2. Udio pojedinih skupina kemijskih spojeva u tinkturi propolisa i mikrokapsulama

	Alkoholna tinktura propolisa	Inkapsulirani propolis
Ukupni polifenoli	25 ± 0,1	24,6 ± 0,04
Ukupni flavonoidi	4,8 ± 0,06	4,78 ± 0,002
Tanini	4,9 ± 0,02	4,8 ± 0,01
Balzamske tvari (%)	14,3 ± 0,2	14,1 ± 0,2

Udio polifenola je izražen u obliku mg galne kiseline/2 ml uzorka, udio flavonoida je izražen u obliku mg kvercetina/2 ml uzorka, udio tanina je izražen u obliku mg katehina/2 ml uzorka

Izvor: Keskin i sur. (2019)

Rezultati pokazuju da nije došlo do značajne promjene u udjelima polifenola, flavonoida, tanina i balzamskih tvari nakon inkapsulacije propolisa. Rezultati su dobiveni HPLC metodom analize, a u sastavu propolisa pronađeni su polifenoli: vanilska kiselina, kafeinska kiselina, kumarinska kiselina, ferulinska kiselina, rutin, cinaminska kiselina i luteolin. Utvrđeno je da mikrokapsule sadrže visoku razinu svih navedenih polifenola, ali s različitim stupnjem inkapsulacije.

De Mélo Silva i sur. u svom istraživanju iz 2019. zabilježili su značajnu antibakterijsku aktivnost nanokapsula propolisa dobivenih metodom emulgiranja. Primijećeno je jače djelovanje nanokapsula propolisa na gram-pozitivne u usporedbi s gram-negativnim bakterijama, a veća osjetljivost gram-pozitivnih bakterija može se pripisati jednostavnijoj građi njihove stanične membrane. Također, zabilježeno je kontrolirano otpuštanje propolisa iz nanokapsula.

5. Zaključak

Propolis je prirodni proizvod pčela i dobar izvor polifenolnih spojeva. Kemijski sastav odnosno udio polifenola u propolisu uvelike ovisi o njegovom botaničkom podrijetlu, geografskom području, vremenu u godini kada je skupljen, ali i o metodi pripreme ekstrakta propolisa. Međutim, sav propolis pokazuje određenu antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost i zbog povoljnog sadržaja polifenola pozitivno utječe na poboljšanje rada imunološkog sustava. Upravo zbog tih svojih karakteristika propolis ima velikog potencija u korištenju kao dodatak prehrani. Inkapsulirani propolis posjeduje vrlo slične, gotovo identične karakteristike kao i propolis koji nije inkapsuliran što znači da sam proces inkapsulacije nema negativnog utjecaja na svojstva propolisa. Inkapsulirani propolis uz sve pozitivne osobine propolisa isto tako ima i svoje prednosti koje se očituju u maskiranju gorkog okusa propolisa, zaštite od štetnog djelovanja visokih temperatura na propolis i kontroliranom otpuštanju korisnih sastojaka u određenim uvjetima. Određeni znanstveni radovi spominju i potencijal primjene inkapsuliranog propolisa u farmaciji, međutim to područje primjene zahtjeva dodatna istraživanja.

6. Literatura

1. Adamowicz E., Śmigielski K., Frydrysiak M. (2015). Mikroinkapsuliranje aktivnih tvari i mirisa za primjenu u tekstilnim materijalima. Stručni rad, Tekstil 64 (3-4) 122-127 (2015.)
2. Ahangari Z., Naseri M. Vatandoost F. (2018). Propolis: Chemical Composition and Its Applications in Endodontics. Iran Endodontic Journal 2018 Summer; 13(3): 285-292. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6064031/> - pristupljeno 31.10.2020.
3. Bankova V., Popova M., Bogdanov S., Sabatini A.G. (2002). Chemical Composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung Tübingen 530-533.
4. Blažanin A. (2015). Inkapsulacija biljnih ekstrakata ionskim geliranjem emulzija. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:551489> – pristupljeno 2.12.2020.
5. Bogdanov S., Bankova V. (2016). The Propolis Book, Chapter 1: Propolis: Origin, Production, Composition. Bee Product Science. www.bee-hexagon.net – pristupljeno 26.10.2020.
6. Bravo L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. Nutrition Reviews, Vol. 56, No. 11, 317-333
7. Burdock G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. Food Chem. Toxicol. 36, 347-363
8. Catchpole O., Grey J.B., Mitchell K.A., Lan J.S. (2004). Supercritical antisolvent fractionation of propolis tincture. Journal of Supercritical Fluids The 29(1-2):97-106 https://www.researchgate.net/publication/222832524_Supercritical_antisolvent_fractionation_of_propolis_tincture - pristupljeno 28.11.2020.
9. Da Silva F.C., Favaro-Trindade C.S., de Alencar S.M., Thomazini M., Balieiro J.C.C. (2011). Physicochemical properties, antioxidant activity and stability of spray-dried propolis. Journal of ApiProduct and ApiMedical Science 3 (2): 94 - 100 (2011)
10. de Mélo Silva I.S., do Amorim Costa Gaspar L.M., Oliveira Rocha A.M., Pereira da Costa L., Batista Tada D., Franceschi E., Ferreira Padilha F. (2019). Encapsulation of Red Propolis in Polymer Nanoparticles for the Destruction of Pathogenic Biofilms. AAPS PharmSciTech (2020) 21:49 DOI: 10.1208/s12249-019-1576-8

<https://link.springer.com/article/10.1208/s12249-019-1576-8> - pristupljeno 15.12.2020.

11. do Nascimento T.G., Redondo G.D.P., de Araújo Abreu C.T., Silva V.C., Lira G.L., Meireles Grillo L.A., da Conceição M.M., Freitas J.D., Souza J.S., Araújo Júnior J.X., Basílio-Júnior I.D. (2019). Modified release microcapsules loaded with red propolis extract obtained by spray-dryer technique. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2019
12. Ernješ M. Određivanje polifenola i flavonola u propolisu UV-VIS spektrofotometrijom. Završni rad, Veleučilište u Požegi
13. Fathi M., Vinceković M., Jurić S., Viskić M., Režek Jambrak A., Donsí F. (2019). Food-Grade Colloidal Systems for the Delivery of Essential Oils. *Food Reviews International*. Volume 37, 2021 – Issue 1
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/87559129.2019.1687514> - pristupljeno 1.3.2021.
14. Gajdašić I. (2018). Ispitivanje protutumorskih učinaka groždanih polifenola *in vitro*. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek
15. Galeotti F., Maccari F., Fachini A., Volpi N. (2018). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Propolis Prepared in Different Forms and in Different Solvents Useful for Finished Products. US National Library of Medicine, National Institutes of Health. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5867556/> - pristupljeno 5.11.2020.
16. Hernández Zarate M.S., Abraham Juárez M.R., Cerón García A., Ozuna López C., Gutiérrez Chávez A.J., Segoviano Garfias J.J.N., Avila Ramos F. (2018). Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. *Food Sci. Technol, Campinas*, 38(2): 210-215, Apr.-June 2018
<https://www.scielo.br/pdf/cta/v38n2/0101-2061-cta-fst29916.pdf> - pristupljeno 13.11.2020.
17. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje (2020). Polimerizacija. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2020. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=49182> – pristupljeno 8.12.2020.
18. Hwa Ong T., Chitra E., Ramamurthy S., Paruvathanahalli Siddalingam R., Hay Yuen K., Periathamby Ambu S., Davamani F. (2017). Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Plos One*.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5376299/pdf/pone.0174888.pdf> - pristupljeno 2.12.2020.

19. İnşaatç Ö., Yaman Turan N. (2018). Encapsulation of Propolis by Complex Coaservation Technique: Preparation and Characterizations. SSRG International Journal of Polymer and Textile Engineering (SSRG - IJPE) – Volume 5 Issue 3 Sep to Dec 2018 https://www.researchgate.net/publication/331064388_Encapsulation_of_Propolis_by_Complex_Coaservation_Technique_Preparation_and_Characterizations - pristupljeno 4.12.2020.
20. Ivanković M. (2007). Polimerni nanokompoziti. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu. Polimeri 28(2007)3:156-167.
21. Jerman S.D. (2018). Kemijska karakterizacija i varijacije u sastavu sirovog propolisa u pčelinjoj zajednici (*Apis mellifera* L.). Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet
22. Jolić N. (2017). Antioksidacijska aktivnost fenola: interakcija derivata hidroksibenzojeve kiseline. Završni rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet
23. Joshi Y. (2015). Supercritical fluids and its applications. Seminarski rad, Chemical Engineering Department, Institute of Technology, Nirma University
24. Jurić M. (2017). Proizvodnja praškastih biljnih ekstrakata sušenjem raspršivanjem. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
25. Jurić S., Jurić M., Król-Kilińska Ž., Vlahoviček-Kahlina K., Vinceković M., Dragović-Uzelac V., Donsí F. (2020). Sources, stability, encapsulation and application of natural pigment sin foods. Food Reviews International. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/87559129.2020.1837862> - pristupljeno 1.3.2021.
26. Kadoić A. (2015). Biodostupnost i zaštitni učinci polifenola. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet
27. Kartika Pratami D., Mun'im A., Hermansyah H., Gozan M., Sahlan M. (2020). Microencapsulation optimization of propolis ethanolic extract from *Tetragonula spp.* Using response surface methodology. International Journal of Applied Pharmaceutics, Vol 12, Issue 4, 2020.

<https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijap/article/view/37808/23129> - pristupljeno 14.12.2020.

28. Keskin M., Keskin Ş., Kolaylı S. (2019). Preparation of alcohol free propolis-alginate microcapsules, characterization and release property. *LWT - Food Science and Technology* 108 (2019) 89–96
29. Kezić N., Bubalo D., Grgić Z., Dražić M., Barišić D., Filipi J., Jakopović I., Ševar M., Krakar D., Tretinjak V (2014). Priručnik Konvencionalno i ekološko pčelarenje. CIP Katalogizacija, Zagreb
30. Kocot J., Kiełczykowska M., Luchowska-Kocot D., Kurzepa J., Musik I. (2018). Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/7074209/> - pristupljeno 5.11.2020.
31. Kosalec I., Bakmaz M., Pepeljnjak S. (2003). Analysis of propolis from the continental and Adriatic regions of Croatia. *Acta Pharm.* 53 (2003) 275-285
32. Kumar S., Pandey A.K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, Volume 2013, Article ID 162750. <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/162750/> - pristupljeno 6.11.2020.
33. Kumazawa S., Hamasaka T., Nakayama T. (Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 84(3):329-339. https://www.researchgate.net/publication/223329661_Antioxidant_activity_of_propolis_of_various_geographic_origins - pristupljeno 11.11.2020.
34. Kurek-Górecka A., Rzepecka-Stojko A., Górecki M., Stojko J., Sosada M., Świerczek-Zięba G. (2013). Structure and Antioxidant Activity of Polyphenols Derived from Propolis. *US National Library of Medicine, National Institutes of Health*, 2014 Jan; 19(1):78-101. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6271064/> - pristupljeno 13.11.2020.
35. Ličanin L. (2016). Primjena tehnika inkapsulacije u stabilizaciji polifenola u dodacima prehrani. Diplomski rad, Kemijsko tehnološki fakultet i Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu
36. Lovrić S. (2014). Fiziološka i ekološka značajnost fenolnih spojeva u biljci. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku

37. Morović M. (2018). Flavonoidi – metaboličke promjene i utjecaj na enzimske sustave. Diplomski rad, Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
38. Munin A., Edwards-Lévy F. (2011). Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics* 2011, 3, 793-829; doi:10.3390/pharmaceutics3040793
39. Oxford dictionary (2020). Cross-link. Lexico powered by Oxford. <https://www.lexico.com/en/definition/cross-link> - pristupljeno 9.12.2020.
40. Plavša N., Nedić N. (2015). Praktikum iz pčelarstva. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet
41. Pozippe Nori M., Silva Favaro-Trindade C., de Alencar S.M., Thomazini M., de Camargo Balierio J.C., Contreras Castillo C.J. (2011). Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *LWT – Food Science and Technology*, Volume 44, Issue 2, March 2011, Pages 429-435. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643810003129> - pristupljeno 4.12.2020.
42. Przybyłek I., Karpiński T.M. (2019). Antibacterial Properties of Propolis. PMC, US National Library of Medicine, National Institutes of Health. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6600457/> - pristupljeno 3.11.2020.
43. Ramljak T. (2008). Skupljanje propolisa silikonskom mrežom. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet
44. Relić B. (2015). Pčelarstvo. MOSTA-NOVE TEHNOLOGIJE, Zagreb
45. Ristivojević P.M. (2014). Određivanje hemijskog sastava, antioksidativnih i antimikrobnih svojstava propolisa topola tipa iz različitih regiona Srbije. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet
46. Sawicka D., Car H., Borawska M.H., Niklinski J. (2012). The anticancer activity of propolis. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, Vol. 50, No. 1, 2012, pp. 25-37 <https://www.researchgate.net/publication/307773680> The anticancer activity of propolis - pristupljeno 11.11.2020.
47. Shehu A., Khalili Rohin M.A., Aziz A.A., Ismail S. (2015). Antifungal characteristic properties and composition of bee glue (propolis). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2015, 7(3): 1992-1996.

https://www.researchgate.net/publication/274703620_Antifungal_characteristic_properties_and_composition_of_bee_glue_Propolis_-_pristupljeno_3.11.2020.

48. Silva E.K., Meireles M.A.A. (2014). Encapsulation of Food Compounds Using Supercritical Technologies: Applications of Supercritical Carbon Dioxide as an Antisolvent. *Food and Public Health* 2014, 4(5): 247-258
49. 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
50. Svečnjak L., Marijanović Z., Okińczyc P., Kuś P.M., Jerković I. (2020). Mediterranean Propolis from the Adriatic Sea Islands as a Source of Natural Antioxidants: Comprehensive Chemical Biodiversity Determined by GC-MS, FTIR-ATR, UHPLC-DAD-QqTOF-MS, DPPH and FRAP Assay. *Antioxidants* 2020, 9, 337; doi:10.3390/antiox9040337
51. Šimunić M. (2016). Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola vrsta *Geranium macrorrhizum* L. i *G. dalmaticum* (Beck) Rech. f., Geraniaceae. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
52. Vehtersbah-Stojan P. (2015). Antioksidansi u aterosklerozi. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.
53. Vinceković M., Viskić M., Jurić S., Giacometti J., Bursać Kovačević D., Putnik P., Donsí F., Barba F.J., Režek Jambrak A. (2017). Innovative technologies for encapsulation of Mediterranean plants extracts. *Trends in Food Science & Technology* Volume 69, Part A, November 2017, Pages 1-12
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224417304533?via%3Dihub> pristupljeno 1.3.2021.
54. Vugrinec K. (2018). Inkapsulacija polifenola maslačka (*Taraxacum officinale* L.) u pektinske sustave nosača primjenom različitih tehnika. Završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:239303> – pristupljeno 2.12.2020.

Životopis

Marko Štrkalj rođen je 11. svibnja 1996. godine u Zagrebu gdje je pohađao Osnovnu školu Bukovac od 2003. do 2011. godine. Po završetku osnovne škole, 2011. godine upisuje III. gimnaziju Zagreb koju je završio 2015. godine. Iste godine upisuje preddiplomski studij "Biljne znanosti" na Agronomskom fakultetu u Zagrebu kojeg je završio 2018. godine. 2018. godine upisao je diplomski studij "Voćarstvo" na Agronomskom fakultetu u Zagrebu gdje je i diplomirao 2021. godine stekavši akademski naziv magistar inženjer hortikulture. Aktivno se služi engleskim jezikom, posjeduje vozačku dozvolu B kategorije i izvrsno se snalazi u radu na računalu uključujući Microsoft Office programski paket.