

Utjecaj različitih metoda ekstrakcije na sastav bioaktivnih spojeva propolisa

Zorić, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:421815>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ivana Zorić

**UTJECAJ RAZLIČITIH METODA EKSTRAKCIJE NA SASTAV BIOAKTIVNIH
SPOJEVA PROPOLISA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Izv. prof. dr. sc. Marijana Hranjec

Članovi povjerenstva:

Izv. prof. dr. sc. Marijana Hranjec, FKIT

Dr. sc. Maja Aleksić, FKIT

Dr. sc. Kristina Starčević, Veterinarski fakultet

Zagreb, srpanj 2015.

SAŽETAK

UTJECAJ RAZLIČITIH METODA EKSTRAKCIJE NA SASTAV BIOAKTIVNIH SPOJEVA PROPOLISA

U okviru ovog rada uspoređivani su ekstrakti dobiveni različitim metodama ekstrakcije propolisa te njihov sastav i antioksidativna svojstva. Prema ranijim istraživanjima dokazana su razna biološka djelovanja propolisa te se on od davnina koristi u ljekovite svrhe. Propolis je ekstrahiran u različitim otapalima pri različitim reakcijskim uvjetima. Sastav ekstrakata određen je spregnutom metodom plinska kromatografija – masena spektrometrija (GC-MS), dok su ukupni polifenoli određeni metodom koja se bazira na Folin-Ciocalteu reagensu. Antioksidativna svojstva određena su DPPH metodom.

Ključne riječi: propolis, cvjetni prah, polifenoli, ekstrakcija, plinska kromatografija, masena spektrometrija, antioksidativna svojstva

SUMMARY

THE INFLUENCE OF THE DIFFERENT EXTRACTION METHODS ON THE COMPOSITION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN PROPOLIS

In this study propolis extracts obtained from different extraction methods were compared, as well as their texture and antioxidative properties. Previously conducted research had demonstrated various bioactive effects of propolis, and is therefore used in medicinal purposes. Propolis was extracted in different solvents at different reaction conditions. The composition of the extracts was determined by coupled method gas chromatography- mass spectrometry (GC - MS), while total polyphenols particular method which is based on the Folin-Ciocalteu reagent. The antioxidant properties are determined by DPPH method.

Key words: propolis, pollen, polyphenols, extraction, gas chromatography, mass spectrometry, antioxidant properties

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Marijani Hranjec, mentorici, na odabranoj temi i na svim savjetima i stručnoj pomoći koju mi je pružila prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Kristini Starčević što me je upoznala sa svim metodama korištenim prilikom izrade ovog rada kao i na stručnoj pomoći.

Zahvaljujem također i svim članovima Zavoda za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije.

Zahvaljujem se tvrtki Hedera d.o.o. za doniranje uzoraka propolisa i dr. sc. Jeleni Šuran voditeljici projekta „Intramamarna formulacija propolisa za prevenciju i tretman mastitisa kod mliječnih preživača“.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Propolis.....	3
2.1.1. Polifenoli.....	4
2.2. Antioksidativna svojstva.....	5
2.2.1. Slobodni radikali.....	5
2.2.2. Antioksidansi.....	6
2.2.3. DPPH metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	7
2.3. Svojstva propolisa s različitih područja.....	8
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
3.1. Materijali i metode.....	22
3.1.1. Biljni materijali.....	22
3.1.2. Dobivanje ekstrakata.....	23
3.1.3. Određivanje sastava ekstrakata spregnutom tehnikom plinskakromatografija- masena spektrometrija.....	25
3.1.4. Određivanje ukupnih fenola u ekstraktima propolisa.....	26
3.1.5. Određivanje antioksidativnih svojstava.....	27
3.2. Rezultati.....	30
3.2.1. Propolis.....	30
4. EKSPERIMENTALNI DIO.....	36
4.1. Opće napomene.....	37
4.2. Ekstrakcija propolisa.....	38
4.3. Ekstrakcija cvjetnog praha.....	45
5. ZAKLJUČAK.....	49
6. LITERATURA.....	51
7. ŽIVOTOPIS.....	53

1. UVOD

Propolis, kao i cvjetni prah, pčele sakupljaju sa raznog cvijeća te ga obogaćuju vlastitim enzimima i koriste za vlastite potrebe u košnici. Ljudi su od davnina primjetili ljekovitost propolisa i cvjetnog praha pa on ima široku uporabu u narodnoj medicini.

Brojna su istraživanja pokazala kako propolis ima razna svojstva kao što su antioksidativno svojstvo, antibakterijsko svojstvo, antimikrobno svojstvo i mnoga druga.

Iako se propolis sastoji od mnogo spojeva i različitih komponenata, jedni od bitnijih bioaktivnih spojeva u propolisu su različiti polifenoli.

2. OPČI DIO

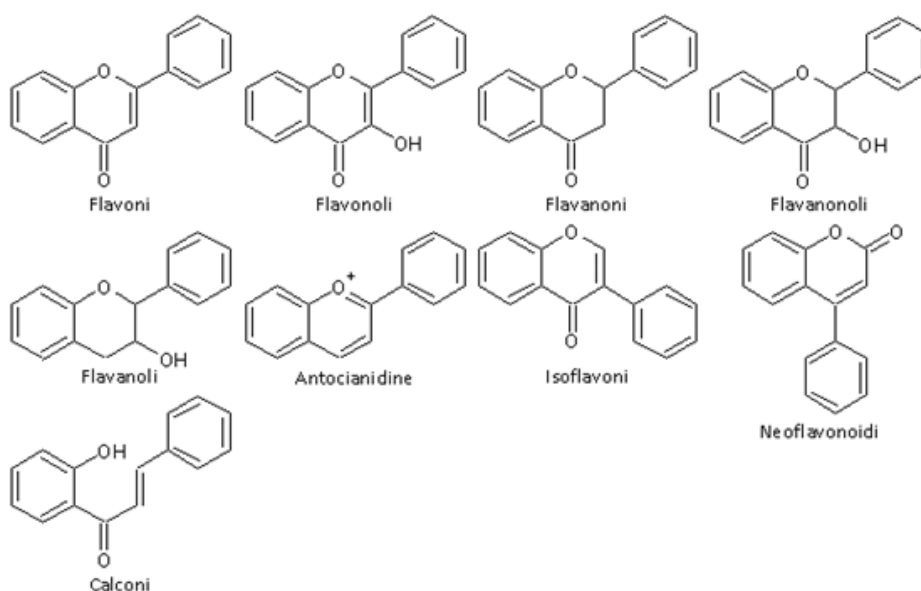
2.1. Propolis

Propolis je smolna smjesa koju pčele prikupljaju s pupoljaka i lišća raznih biljaka. Smatra se da je propolis dobio ime od grčke riječi “pro” - prije ili ispred i “polis”-grad¹. Pčele sakupljaju propolis iz biljnog izvora te ga oplemenjuju s enzimima, beta-glukozidazama, koje luče iz submandibularnih žlijezda slinovnica, zatim ga odlažu u košnicu gdje im služi za krpanje pukotina i rupa, zatvaranje ulaza te za obranu od raznih mikroorganizama. Ovisno o područjima i biljkama s kojih je sakupljen, razlikujemo razne tzv. kemo-tipove propolisa. U području Hrvatske i dobrog dijela sjeverne hemisfere naići ćemo na *Topola-tip* propolisa. Iz samog imena je jasno da pčele u ovom području najčešće propolis prikupljaju sa stabla topole. U Brazilu ćemo npr. naići na *Zeleni propolis*, koji je ime dobio po svojoj zelenoj boji, a pčele ga najčešće prikupljaju s drva bakaris, dok ćemo u Rusiji naići na *Breza-tip* propolisa itd. Iako propolis s različitih područja ima različiti kemijski sastav, njegova je uloga u pčelinjim košnicama ista. Što se tiče kemijskog sastava, kod *Topola-tipa* propolisa možemo pronaći najviše polifenolnih frakcija koji se još zovu smola ili balzami, a u sirovom propolisu ih ima do 55% te voska kojeg ima do 35%. Također, možemo pronaći i do 2,8% hlapljivih sastojaka, odnosno eteričnih ulja apoludi može biti do 10%. Ostatak čine minerali u tragovima, željezo, bakar, vitamini, steroidi i ugljikohidrati te nečistoće kao što su ostatci pčela. U procesu nastajanja propolisa, pčele mu prvi put promijene kemizam, odnosno kemijski sastav. Prikupljenom propolisu s biljaka pčele svojim enzimima beta-glukozidazama otklanjaju šećernu komponentu koja je bila prisuta na biljci te komponente postaju lipofilne i možemo ih jednostavno ekstrahirati u otopini etanola. Etanol koji koristimo u te svrhe mora biti onaj koji se koristi u farmaceutske svrhe jer ima dovoljno visoku čistoću². Upravo ekstrahiranjem propolisa iz njega možemo izvući komponente koje više želimo, odnosno možemo se riješiti neželjenih komponenata. Jedna od neželjenih komponenata zasigurno je vosak jer inhibira resorpciju bioaktivnih tvari i na koži stvara tanki film. Također, unutar propolisa možemo naići na neke alergenske tvari koje stvaraju alergiju tipa IV, odnosno crvenilo na koži. Neki od alergena su 1,1-dimetilaliletilni ester kavene kiseline, cimetni aldehid, benzil-cinemat i drugi. Tih alergenskih tvari možemo se riješiti ekstrakcijom. Međutim, to ne možemo napraviti selektivno, odnosno uz alergenske tvari ili vosak ekstrahirat će nam se i neke bioaktivne komponente. Da bismo odredili sastav sirovog propolisa, nakon što ga ekstrahiramo, najčešće ćemo koristiti tankoslojnu kromatografiju uz spektrofotometrijske postupke ili

tekućinskukromatografiju visoke učinkovitosti. Propolis se od davnina koristi u ljekovite svrhe. Iako ima tradicionalnu ulogu pri liječenju određenih bolesti, propolis prema nizu direktiva Europske unije uključujući i pravne direktive, nije lijek. Neka od bitnijih bioloških djelovanja propolisa uključuju antibakterijsko, antimikrobno, antiupalno, antioksidativno i druga djelovanja. Dobro ga je koristiti za infekcije gornjeg dišnog sustava, kod nadraženog stanja i upale kože sluznice uzorkovanih mikrobima te primjenom na usta za jačanje imunološkog sustava, odnosno kao dodatak prehrani.

2.1.1. Polifenoli

Polifenoli su velika skupina fitokemikalija, odnosno bioaktivnih organskih molekula pronađenih u biljkama, koji se sastoje od fenolnih jedinica. Nastaju kao produkt sekundarnog metabolizma biljaka. Oni biljkama daju boju, aromu ili okus, utječu na otpornost biljaka prema mikroorganizmima te štite biljne stanice od štetnih zračenja. Ljekovito djelovanje propolisa proizlazi flavonoida, fenolnih kiselina i njihovih estera. Flavonoidi su podvrsta polifenola. Poznato je oko 5000 vrsta flavonoida. Postoji mnogo podvrsta flavonoida kao što suflavoni, flavonoli (3-hidroksiflavoni), flavanoni (2,3-dihidroksiflavoni), antocijanidi, katehini i mnogi drugi. Na Slici 1. prikazana je struktura nekih vrsta flavonoida.



Slika 1. Struktura određenih podvrsta flavonoida (Chemdraw)

Znanstveno dokazana djelovanja flavonoida su antiinflamatorno, antimikrobno, antifungalno, diuretičko, antihepatotoksično, antihipertenzivno, analgetsko, hipoglikemijsko, antikoagulirajuća, kardiotonična, antioksidativna i druga³.

2.2. Antioksidativna svojstva

2.2.1. Slobodni radikali

Slobodni radikal je bilo koja molekula koja sadrži jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci. Slobodni radikali nastaju homolitičkim cijepanjem kovalentne veze pri čemu svaki elektron ostaje vezan na susjednom atomu. Stalni su produkt staničnog metabolizma te su vrlo reaktivni. Reakcije slobodnih radikala zbivaju se kao lančane reakcije, odnosno jedan radikal potiče stvaranje drugoga. Uzroci nastajanja slobodnih radikala u organizmu mogu biti endogeni i egzogeni. Endogeni uzroci su aktivacija imunih stanica, upala, mentalni stres, intenzivna tjelovježba, infekcija, karcinom, proces starenja i mnogi drugi.

Egzogeni uzroci su zagađenje zraka ili vode, dim cigareta, alkohol, teški metali, neki lijekovi, industrijska otapala, radijacija i drugi. Slobodni radikali su uzročnici starenja jer uzrokuju oštećenje staničnih makromolekula.

Reakcije u kojima nastaju slobodni radikali su **redoks reakcije**. Najvažniji slobodni radikali su reaktivne kisikove i dušikove vrste (ROS i RNS). Najveći dio kisikovih radikala nastaje u mitohondrijima, pri stvaranju ATP-a, putem niza procesa oksidativne fosforilacije, redukcije O_2 do H_2O . Pri tome bi O_2 trebao primiti 4 elektrona a može se dogoditi da O_2 primi samo 1 ili 2 elektrona pri čemu nastaje O_2^- ili H_2O_2 koji može prijeći u drugi oblik slobodnog radikala.

Lipidna peroksidacija napad je slobodnih radikala na dvostruke veze masnih kiselina. Prisutnost dvostrukih veza u masnim kiselinama oslabljuje C-H veze na atomu ugljika u blizini dvostruke veze te tako premještanje vodika čine lakšim. Lipidna peroksidacija nastaje u tri stupnja inicijacije, propagacije i terminacije. Reakcija počinje oduzimanjem vodika s nezasićene masne kiseline ($LH \rightarrow L\cdot$) pri čemu nastaje lipidni radikal. Lipidni radikal ($L\cdot$) tada reagira s kisikom stvarajući peroksilni radikal ($L\cdot + O_2 \rightarrow LOO\cdot$). Lančana reakcija započinje kada peroksidni radikal oduzima atom vodika drugoj molekuli masne kiseline ($LOO\cdot + LH \rightarrow LOOH + L\cdot$). Prisutnost iona prijelaznih metala inicira daljnje stvaranje radikala ($LOOH + Fe^{2+} \rightarrow LOO\cdot + OH^- + Fe^{3+}$). Pod djelovanjem iona prijelaznih metala, najčešće bakra i željeza, lipidni peroksidi stvaraju mnogobrojne razgradne produkte kao što su aldehidi, ketoni,

ugljikovodici, epoksidi, do aktivnih radikala. **Malondialdehid** (MDA) pokazatelj je peroksidacije. U fiziološkim se uvjetima nalazi u obliku enolatnog iona koji reagira s proteinima pokazujući afinitet prema lizinskom aminokiselinskom ostatku. Gvanin u DNA jedno je od ciljanih mjesta malondialdehida, što može stvoriti mutagena oštećenja. Osim toga, postoji još mnogo toksičnih skupina spojeva lipidne peroksidacije.

Oksidacijski stres je stanje koje nastupa kad se poremeti ravnoteža količine proizvedenih ROS/RNS. Uzrokuju ga nagomilavanje oštećenih makromolekula, povećanje količine prooksidansa i nedostatak antioksidansa. U stanju oksidacijskog stresa dolazi do prekomjernog stvaranja slobodnih radikala te njihovog nagomilavanja u organizmu što rezultira zatajenjem obrambenog mehanizma. Iako u organizmu postoji stanična antioksidativna zaštita, starenjem se stvaranje antioksidansa znatno smanjuje. Zato je s vremenom potrebno unositi sve više antioksidansa hranom.

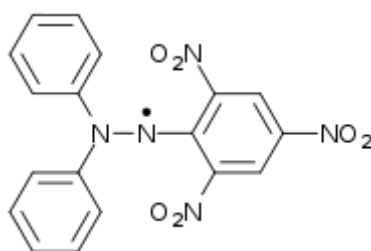
2.2.2. Antioksidansi

Antioksidansi podrazumijevaju raznovrsnu skupinu molekula koje, ako su prisutne u niskim koncentracijama u usporedbi s koncentracijama oksidativnog supstrata, značajno zadržavaju ili priječe oksidaciju tog supstrata, kontroliraju odnos između stanja reduciranja ili oksidiranja u biološkom sustavu. Antioksidansi mogu nastati u stanici ili se mogu unijeti hranom. Oni onemogućuju stvaranje novih slobodnih radikala u organizmu ili uništavaju u organizmu već stvorene radikale ili pak popravljaju oštećenja u organizmu nastala djelovanjem radikala. Možemo ih podijeliti na više načina. Među najjednostavnijim je podjela na antioksidacijske enzime i male molekule antioksidansa. U antioksidacijske enzime ubrajamo one koje nastaju u stanicama te razgrađuju manje oblike kisikovih radikala u nenabijene neaktivne molekule i enzime koji obnavljaju slobodnim radikalima oštećene DNA molekule i proteine. Male molekule oksidansa djeluju kao "čistači" slobodnih radikala, odnosno pretvaraju nezasićene molekule radikala u one zasićene, odnosno inaktivne oblike koji nisu opasni za normalno funkcioniranje organizma. Prema podrijetlu ih možemo podijeliti na prirodne i sintetske antioksidanse. Tijekom lančanih reakcija antioksidansi mogu djelovati kao preventivni antioksidansi da sprječavaju nastajanje slobodnih radikala, kao enzimatski antioksidansi, odnosno da sprječavaju lančane reakcije slobodnih radikala te kao "hvatači slobodnih radikala" koji reagiraju sa slobodnim radikalima

te ih stabiliraju. Najznačajniji prirodni antioksidansi su vitamin C (askorbinska kiselina), vitamin E (tokoferol), fenolni spojevi, dok je najjači prirodni antioksidans astaksantin⁴.

2.2.3. DPPH metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti

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



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

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



DPPH· intenzivno apsorbira u vidljivom dijelu spektra pri valnoj duljini od 517nm. Kad prijeđe u DPPH oblik dolazi do smanjenja apsorpcije, a kao posljedica njegove redukcije s antioksidansom dolazi do promjene boje iz intenzivno ljubičaste u žutu. Reakcija se prati spektrofotometrijski pri 517nm. Nakon 30 minuta mjerenja očita se apsorbancija te se računa postotak inhibicije radikala prema izrazu 2.3.

$$\% \text{ inhibicije DPPH}\cdot = \frac{(A_{co} - A_{At})}{A_{co}} \cdot 100 \quad (2.3.)$$

Gdje je

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

$A_{A(t)}$ = apsorbancija reakcijske smjese nakon $t = 30$ minuta.

2.3. Svojstva propolisa s različitih područja

F.A. Santos⁵ i suradnici 2001. godine proučavali su antibakterijsku aktivnosti brazilskog Propolisa i njegovih frakcija prema anaerobnim bakterijama. Propolis prikupljen s područja Carrada, grad Cachoeira da Prata, savezne države Minas Gerais u Brazilu, podvrgnut je kolonskoj kromatografiji, a za nosač tekuće nepokretne faze korišten je silikagel. Propolis i frakcije otopljeni su u vodenoj otopini etanola i dobivenim ekstraktima testirane inhibicije djelovanja bakterija koje uzrokuju paradontitis, odnosno skup upalnih bolesti tkiva koje okružuju i podupiru zube. Sve ispitivane bakterijske vrste bile su osjetljive na ekstrakte propolisa. Dvije frakcije propolisa pokazale su antibakterijsku aktivnost a minimalna koncentracija inhibiranja (MIC) kreće od 64 do 1023 µg/mL. U tablicama 1. i 2. prikazana je osjetljivost devet anaerobnih sojeva bakterija u usnoj šupljini na frakcije propolisa dobivene različitim metodama frakcioniranja.

Tablica 1. Osjetljivost devet anaerobnih sojeva bakterija u usnoj šupljini na dobivene frakcije propolisa iz ekstrakta

Sojevi bakterija	MIC (µg/mL)							
	PAE	Vodne frakcije	NaHCO ₃ frakcije	Na ₂ CO ₃ frakcije	NaOH frakcije	ostatak	Meropenem	Penicilin G
Aa FDC Y4	1024	> 1024	> 1024	1024	> 1024	> 1024	0.5	4
Aa ATCC 29 253	1024	> 1024	> 1024	512	> 1024	> 1024	0.5	4
Fn ATCC 10 953	1024	> 1024	> 1024	512	> 1024	> 1024	0.06	4
Fne ATCC 25 386	256	> 1024	> 1024	512	> 1024	> 1024	0.03	1
Pg ATCC 33 277	256	> 1024	256	256	> 1024	1024	1	0.03
Pi ATCC 25 611	256	> 1024	256	256	> 1024	512	2	0.06
Pn ATCC 33 563	512	> 1024	256	512	> 1024	512	2	0.03
EI ATCC 25 559	1024	> 1024	> 1024	512	> 1024	> 1024	8	4
Pa ATCC 27 337	128	> 1024	256	256	1024	512	8	4

Tablica 2. Osjetljivost devet anaerobnih sojeva bakterija u usnoj šuljini na frakcije propolisa te ekstrakata podvrgnutih kolonskoj kromatografiji

Sojevi bakterija	MIC (µg/mL)							
	PAE	HEX ^b	HEX/DCM	DCM	DCM/ EtOAc	EtOAc	EtOAc/ MeOH	MeOH
Aa FDC Y4	1024	> 1024	> 1024	>1024	1024		> 1024	> 1024
Aa ATCC 29 253	1024	> 1024	> 1024	>1024	1024	1024	> 1024	> 1024
Fn ATCC 10 953	1024	> 1024	> 1024	>1024	1024	1024	> 1024	> 1024
Fne ATCC 25 386	256	> 1024	> 1024	256	64	64	64	64
Pg ATCC 33 277	256	> 1024	> 1024	512	512	1024	1024	1024
Pi ATCC 25 611	256	> 1024	> 1024	128	64	256	128	128
Pn ATCC 33 563	512	> 1024	> 1024	256	128	512	1024	1024
Ei ATCC 25 559	1024	> 1024	> 1024	>1024	> 1024	> 1024	> 1024	> 1024
Pa ATCC 27 337	128	> 1024	> 1024	256	64	128	64	256

Dvije metode frakcioniranja dale su frakcije koje su pokazale antibakterijsku aktivnost, s vrijednostima MIC između 64 µg/mL i 1024 µg/mL. TLC i HPLC analize ekstrakata pokazale su prisutnost polifenolnih spojeva raznovrsnog polariteta. Niti jedna ispitana frakcija nije bila puno aktivnija od cijelog ekstrakta, što ukazuje da je antibakterijska aktivnost propolisa rezultat sinergističkog učinka više spojeva.

S. Arslan⁶ i suradnici proučavali su 2011. antimikrobnu aktivnost Topola-tipa propolisa na mutante streptokoka i karijesa razvijenog kod štakora te zasebno antimikrobni utjecaj ekstrakata propolisa iz etanola, metanola, kloroforma, heksana, propilen glikola i etil-acetata na *Streptococcus mutants* UA159 i *Streptococcus sobrinus* 6715. MIC i minimalna baktericidna koncentracija (MBC) određene su pomoću metode makrorazrjeđivanja prema standardima Nacionalnog odbora za klinički laboratorij. Štakori su bili zaraženi sa *S.sobrinus* te su bili podvrgnuti kariogenitičkoj dijeti. Dva puta dnevno kroz pet tjedana dobivali su ekstrakte propolisa iz etanola (EEP) i heksana (HEP). Nakon perioda eksperimenta, bili su ispitivani njihovi mikrobní sastavi zubnog plaka i karijesa.

Tablica 3. MIC, MBC i vrijednost prijanjanja ekstrakata propolisa i CHX protiv *S. mutants* i *S. sobrinus*

Ekstrakti	Streptococcus mutants			Streptococcus sobrinus		
	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	Prijanjanje (O.G.)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	Prijanjanje (O.G.)
EEP	50	400	1.135	100	200	0.282
MEP	50	100	1.042	50	400	0.331
EtAcEP	50	200	0.996	50	400	0.329
PGEP	100	400	1.025	50	400	0.236
ChloEP	100	400	1.021	100	800	0.258
HEP	100	400	1.045	50	100	0.406
CHX	0.5	2	0.862	0.125	1	0.277
Etanol	-		1.051	-	-	0.287

EEP- ekstrakt propolisa u etanolu

MEP- ekstrakt propolisa u metanolu

EtAcEP- ekstrakt propolisa u etil-acetatu

PGEP- ekstrakt propolisa u propilen glikolu

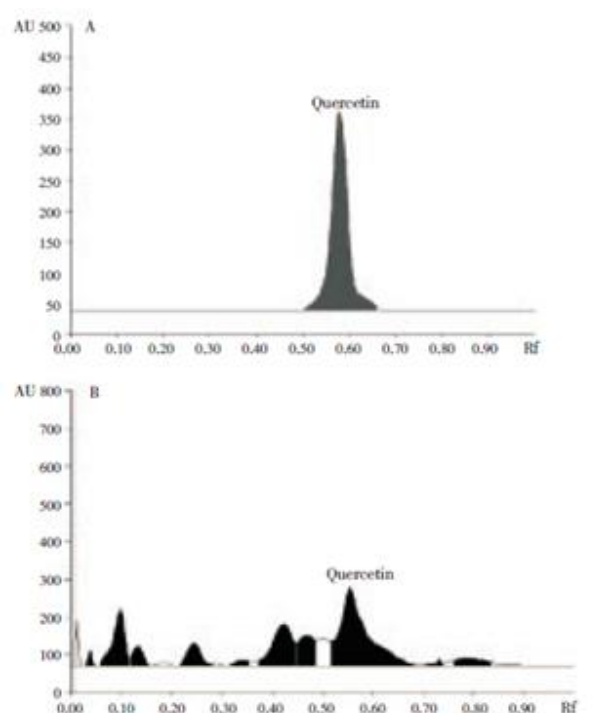
ChloEP- ekstrakt propolisa u kloroformu

HEP- ekstrakt propolisa u heksanu

O.G.-Optička gustoća

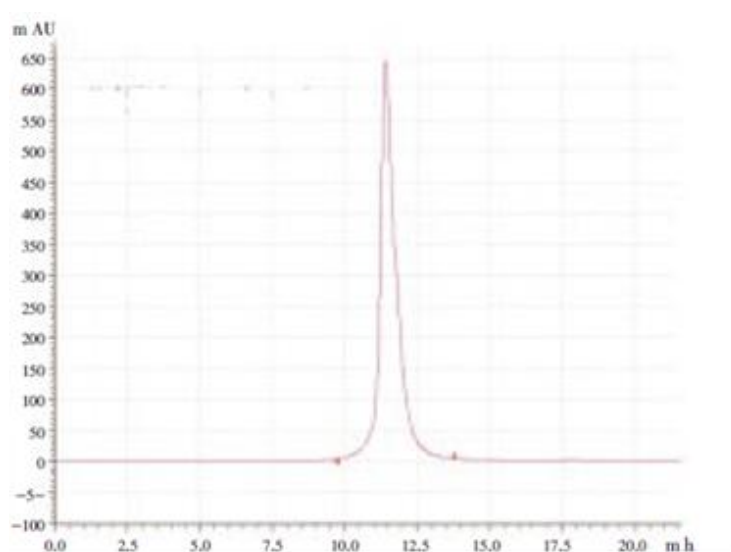
EEP i HEP pokazali su najveću antimikrobnu aktivnost prema testiranim mikroorganizama. Kemijski sastav EEP i HEP određen je koristeći plinsku kromatografiju) uz masenu spektrometriju (GC-MS). Glavne kemijske komponente pronađene u oba ekstrakta su pinobanksin((2S,3R)-3,5,7- trihidroksi-2-fenil-kroman-4-on) i naringenin(5,7-dihidroksi-2- (4-hidroksifenil) kroman-4-on). Topla-tip propolisa pokazao je antimikrobno djelovanje protiv mutanata streptokoka, što znači da se može koristiti u prevenciji karijesa.

R. Thirugnanasampandan⁷ i suradnici su 2012. godine analizirali kemijski sastav i bioaktivna svojstva Indijskog propolisa. Etanolni ekstrakt propolisa analiziran je GC-MS, HPTLC i HPLC metodama te su mu analizirana antioksidativna svojstva, antikolinestereza tj. inhibiranje enzima acetilkolinestereze i citotoksičnosti. GC-MS analiza pokazala je prisutnost masnih kiselina, alkohola i kvercetina (C₁₅H₁₀O₇). Kvercetin je identificiran i kvalificiran HPTLC i HPLC metodama. Na slici 3. prikazan je HPTLC denzitogram kvercetina (A) i etanolnih ekstrakcija propolisa (B).



Slika 3. HPTLC denzitogram kvercetina (A) i etanolnih ekstrakcija propolisa (B)

Na slici 4. prikazan je HPLC spektar kvercetina u propolisu.



Slika 4. HPLC spektar kvercetina u propolisu

Antioksidativna svojstva ekstrakata propolisa određena su pomoću DPPH metode. Inhibicija lipidne peroksidacije bila je značajna. Citotoksičnost prema stanicama raka pluća i dojke bila je izražena. Ovo istraživanje pokazalo je da bioaktivne komponente pronađene u propolisu mogu ublažiti određene bolesti i mogu biti korisne za zdravlje ljudi.

Soraia I. Falcao⁸ i suradnici su 2012. godine istraživali profil fenola u portugalskom propolisu LC-MS spektrometrijom. Detaljno su okarakterizirali fenolne spojeve portugalskog propolisa iz različitih regija i s različitih otoka. Četrdeset etanolnih ekstrakata propolisa analizirani su LC-MS metodom. Na Slici 5. možemo uočiti područja s kojih je propolis sakupljen (N-kontinentalni sjever, CI- centaralna unutrašnjost, CC-centralna obala, A- Azori, M- Otočje Madejra i S- jug). Svi uzorci propolisa sakupljeni su nakon sezone pčelinje žetve (od mjeseca svibnja do studenog), konvencionalnim struganjem ili preko plastičnih ekrana.



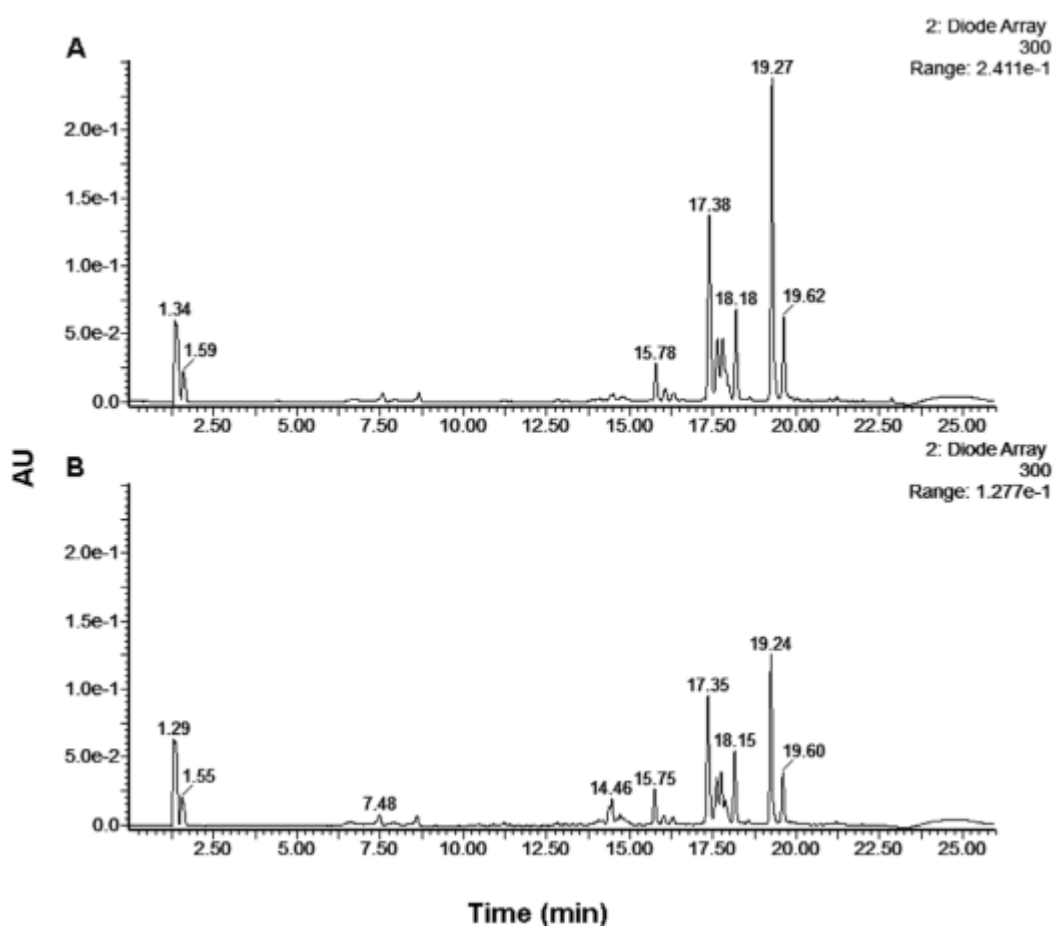
Slika 5. Područja s kojih je sakupljen propolis (Portugal)

U uzorcima je detektirano 76 polifenolnih vrsta te su utvrđene dvije vrste propolisa, *umjereni propolis* tj. česti tip koji sadrži tipične polifenole za Topola-tip propolis kao što su flavonoidi i njihove metilnoesterifikacijske forme, fenilpropanske kiseline i njihove estere te *rjeđi tip propolisa* s neobičnim sastavom koji uključuje kvercetin i kaemferol-glikozid, neke od njih nikad nisu još opisane u propolisu. U Tablici 4. može se uočiti u kojim je područjima Portugala pronađen česti tip propolisa, a u kojim je pronađen rijetki tip propolisa. Metoda sakupljanja 1 označava sakupljanje konvencionalni struganjem, a metoda sakupljanja 2 označava metodu skupljanja preko plastičnih ekrana. U tablici je također navedena godina skupljanja propolisa.

Tablica 4. Fenolni profil portugalskog propolisa sa različitih područja

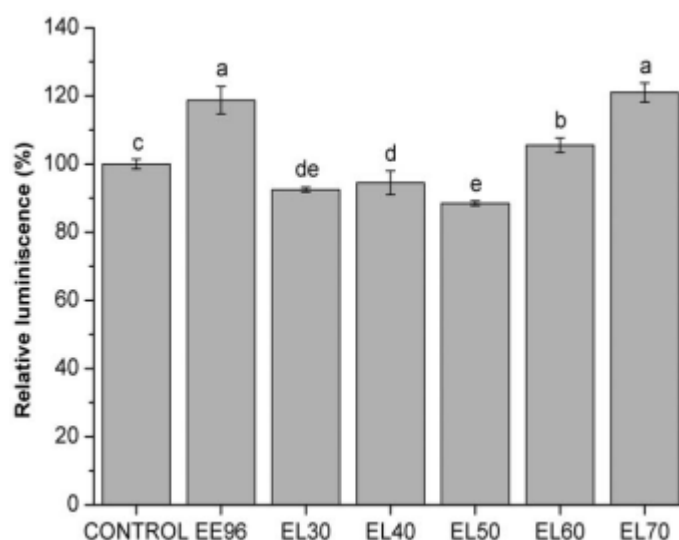
kod	Geografska lokacija	godina	Metoda sakupljanja	Tip propolisa
N1	Baraganca	2007	1	Česti
N2	Baraganca	2007	2	Česti
N3	Baraganca	2008	2	Česti
N4	Baraganca	2009	1	Česti
N5	Baraganca	2009	1	Česti
N6	Baraganca	2009	1	Česti
N7	Miranda de Douru	2009	1	Česti
N8	Mirandela	2009	2	Česti
N9	Chaves	2009	2	Česti
N10	Chaves	2009	2	Česti
N11	Montalegre	2009	1	Rijetki
N12	Boticas	2009	1	Rijetki
N13	Boticas	2009	1	Rijetki
N14	Barcelos	2009	1	Česti
CI1	Guarda	2010	1	Rijetki
CI2	Penamacro	2009	1	Česti
CI3	Fuadão	2009	1	Česti
CI4	Nisa	2009	2	Česti
CC1	Figueira de Foz	2009	2	Česti
CC2	Leiria	2009	1	Česti
CC3	Coruche	2009	2	Česti
CC4	Ramada	2009	1	Česti
S1	Aljezur	2009	1	Česti
S2	Aljezur	2009	1	Česti
S3	Aljezur	2009	1	Česti
S4	Moncarapacho	2009	1	Rijetki
A1	Terceria otok, Azori	2009	1	Česti
A2	Sv. Miguel otok Azori	2009	1	Česti
A3	Sv. Miguel otok Azori	2009	1	Česti
A4	Sv. Miguel otok Azori	2009	1	Česti
A5	Sv. Miguel otok Azori	2009	1	Česti
A6	Sv. Miguel otok Azori	2009	1	Česti
A7	Sv. Miguel otok Azori	2009	1	Česti
A8	Sv. Miguel otok Azori	2009	1	Česti
A9	Sv. Miguel otok Azori	2009	1	Česti
A10	Sv. Miguel otok Azori	2009	1	Česti
A11	Sv. Miguel otok Azori	2009	1	Česti
M1	Funchal, Otočje Madeira	2009	1	Česti
M2	Funchal, Otočje Madeira	2009	1	Rijetki
M3	Funchal, Otočje Madeira	2009	1	Česti

T. Petelinc⁹ i suradnici su 2013. godine provodili su frakcioniranje fenolnih spojeva ekstrahiranih iz propolisa te istraživali njihovu aktivnost u vrsti kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Uzorak propolisa sakupljen je u Savinjskoj dolini u Sloveniji u jesen 2010. godine. Uzorak je ekstrahiran u 70%-tnoj otopini etanola te je ekstrakt uparen do suha. Zatim je podvrgnut ekstrakciji u čvrstoj fazi (SPE) koja se koristi za čišćenje sirovog ekstrakta propolisa pri čemu se odvoji u pet elucijskih frakcija prema polaritetu. Nakon 96 sati inkubacije kvaščevi su bili tretirani ili čistim propolisom (EE96) ili nekim od elucijskih frakcija (EL30 do EL70). Nakon 2 sata inkubacije uzorci su uzeti za analiziranje te su analizirani tekućinskom kromatografijom s detekcijom dioda-poljem (LC – DAD).



Slika 6. LC - DAD (300 nm) kromatogram fenolnih spojeva u inkubacijskom mediju prije (A) i posije (B) 2h izloženosti kvasca *Saccharomyces cerevisiae* eluacijskoj frakciji EL70

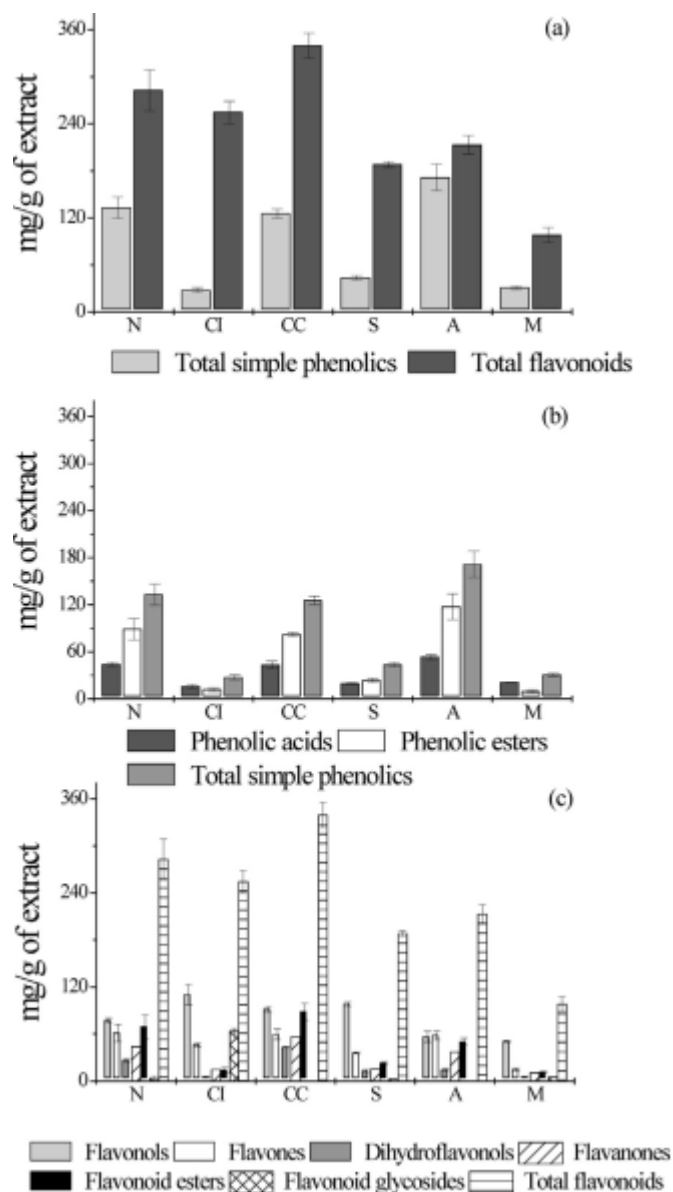
Na slici 6. prikazan je LC – DAD kromatogram fenolnih spojeva u inkubacijskom mediju prije i poslije izloženosti kvasca eluakcijskoj frakciji EL70. Mjerenje je provođeno pri valnoj duljini od 300nm. Unutarstanična oksidacija procijenjena je korištenjem H₂DCF koji reagira s oksidansima. Energija staničnog metabolizma određena je valijabilnošću stanica mikroorganizama.



Slika 7. Energija staničnog metabolizma u kvascu *S. cerevisiae* tretiran sa EE96 i EL30 do EL70

S pojedinim frakcijama iz propolisa, dobivenih ekstrakcijom suhe faze (SPE), popravljene su promjene u unutarstaničnoj oksidaciji i energiji staničnog metabolizma kod tih kvasaca. Najučinkovitija frakcija je dalje istraživana u skladu sa svojim fenolnim spojevima.

Soraia I. Falcao¹⁰ i suradnici su 2013. godine proučavali su kvantifikaciju fenola i botaničko podrijetlo portugalskog propolisa. Cilj njihovog istraživačkog rada bilo je kvantificiranje sadržaja fenola u propolisu iz različitih portugalskih regija s različitim cvjetnim izvorima, pupoljci biljke *Populus x Canadensis Moench* i *Cistus ladanifer L.*, kako bi se ustanovila veza geografskog i botaničkog podrijetla. Na slici 8. možemo uočiti masene odnose pojedinih komponenata propolisa i mase ekstrakta po područjima s kojih je skupljen propolis.



Slika 8. Sastav glavnih polifenolnih spojeva uzoraka propolisa sa sjevera (N), središnjeg kontinenta (CI), središnje obale (CC), juga (S), Azora (A) i otočja Madeira (M)

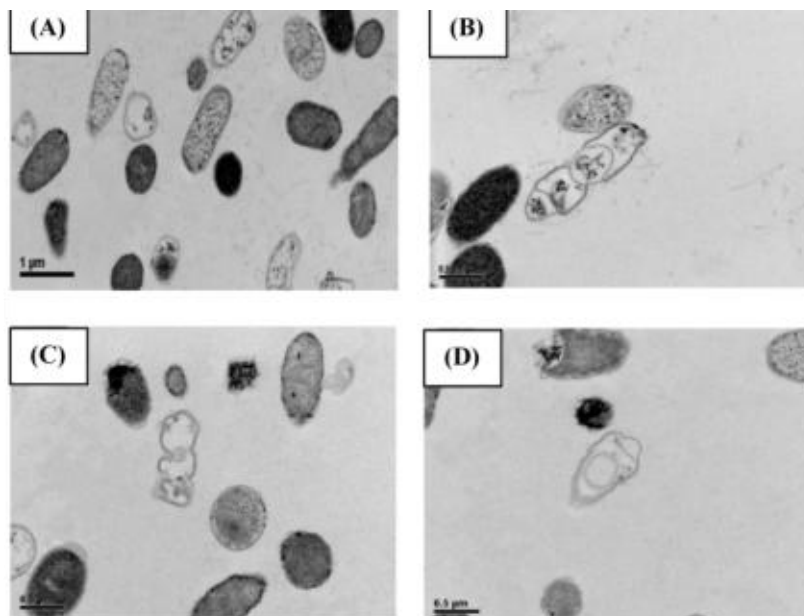
U propolisu iz svih regija Portugala uobičajena je velika koncentracija flavonoida, međutim flavonoida ima najviše u propolisu iz srednje unutrašnjosti, juga i otočja Madeira. Topola-tip propolis svojstven umjerenim zonama pronađen je na sjeveru Portugala, centralnoj obali i na Azorima, dok su u uzorcima s juga Portugala i središnje unutrašnjosti pronađeni derivati kemferola, vrste flavonoida, pokupljeni s grma, *C. ladanifer exudates*, rasprostranjenom po Mediteranu.

P. Boonsai¹¹ i suradnici su 2014. godine istraživali antibakterijsku aktivnost Kardanola iz propolisa iz grada Apis Mellifera, u Tajlandu. Antibakterijska aktivnost određivana je prema Gram-pozitivnim bakterijama (*Staphylococcus aureus* i *Paenibacillus larvae*) i Gram-negativnim bakterijama (*Escherichia coli*). Vrsta bakterije određena je metodom bojanja po gramu i analizom djelomičnih odsječaka 16S rDNA. Propolis je ekstrahiran metanolom, diklormetanom i heksanom. Najaktivniji sirovi ekstrakt se dalje pročišćavao pomoću brze kolone i apsorpcijske kromatografije. Čistoća svake bioaktivne frakcije testirana je tankoslojnom kromatografijom. Kemijska struktura izoliranog bioaktivnog spoja analizirana je pomoću nuklearne magnetske rezonancije (NMR).

Tablica 5. Karakterizacija, prinos i TLC obrasaci sedam frakcija propolisa, dobivenih ekstrakcijom u diklormetanu, nakon kromatografije brzih kolona

Frakcija	Izgled	Masa(mg)/ prinos %	TLC obrasac
Q1	Žut, ljepljive smole	42.4 / 0.195	Nema vrpce
Q2	Žut, ljepljive smole	18.9 / 0.087	Nema vrpce
Q3	Žut, ljepljive smole	133.2 / 0.613	Odvojene vrpce
Q4	Žut, ljepljive smole	25.5 / 0.117	premaz
Q5	Žut, ljepljive smole	33.6 / 0.155	premaz
Q6	smeđ, ljepljive smole	25.3 / 0.116	Nema vrpce
Q7	smeđ, ljepljive smole	561.7 / 2.586	Nema vrpce

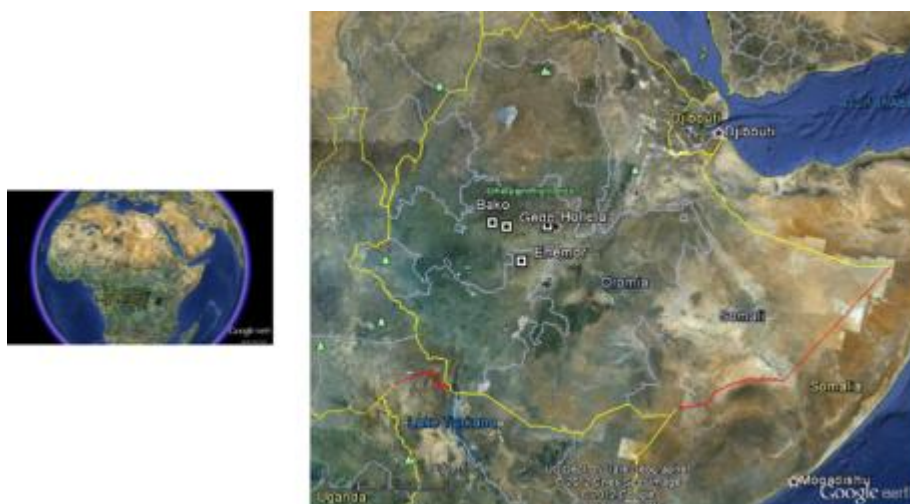
Sirovi metanolni ekstrakt propolisa pokazao je najbolju antibakterijsku aktivnost s MIC vrijednostima od 5 mg/mL. Nakon kromatografije brzih kolona samo su tri aktivne frakcije inhibirale rast bakterija *S. aureus* i *E. coli*. Na slici 9. prikazana je snimka transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM) koja pokazuje utjecaj frakcije propolisa (kardanola) iz diklormetilnog ekstrakta (CME). Slika A i B prikazuju stanice koje nisu tretirane frakcijom propolisa, dok slike C i D prikazuju tretirane stanice.



Slika 9. TEM snimka koja prikazuje utjecaj CME frakcije na morfologiju *E. coli*

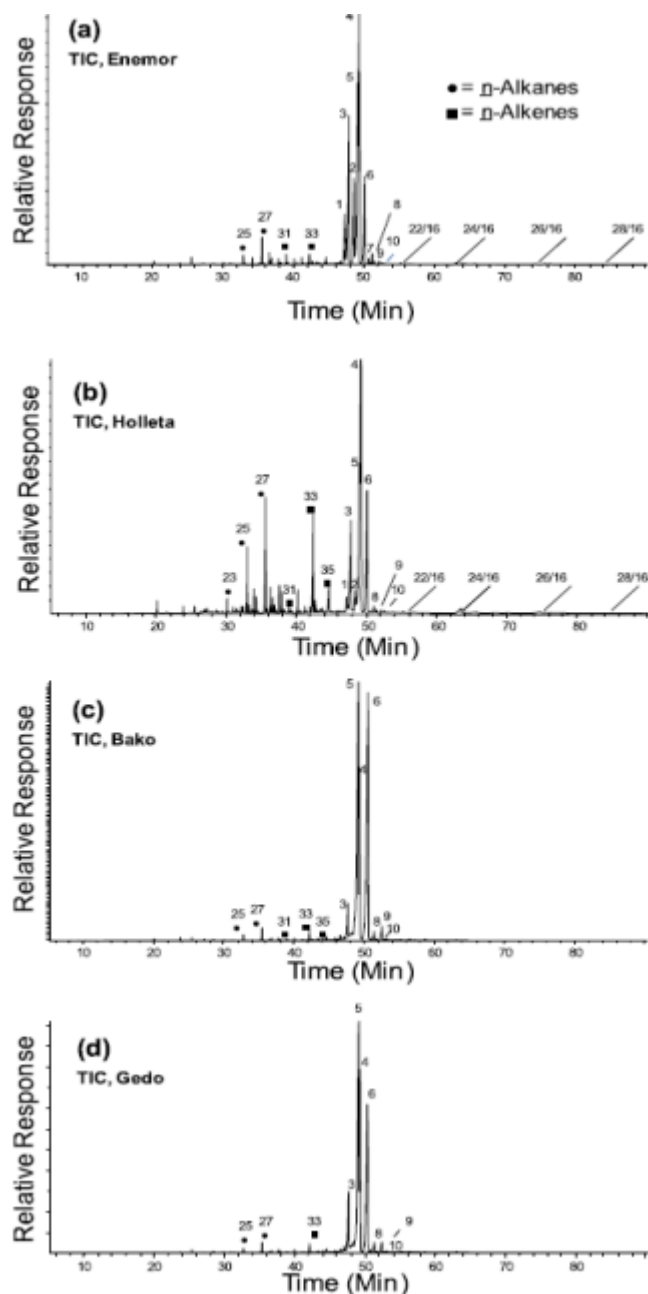
Istraživanje je pokazalo kako tajlandski propolis sadrži obećavajuću antibakterijsku aktivnost.

Ahmed I Rushdi¹² i suradnici su 2014. godine proučavali karakterizaciju i kemijski sastav propolisa iz Etiopije. Također su određivali i relativnu koncentraciju organskih tvari u uzorcima propolisa sakupljenih s četiri različita područja u Etiopiji. Uzorci su prikupljeni u središtu Etiopije na područjima više i niže nadmorske visine. Na slici 10. prikazana su područja s kojih su prikupljeni uzorci propolisa.



Slika 10. Područje s kojeg su prikupljeni uzorci propolisa prikazano na karti

Uzorci propolisa estrahirani su smjesom diklormetana i metanola kako bi se omogućilo estrahiranje i polarnih i nepolarnih komponenata, te su podvrgnuti plinskoj kromatografiji u kombinaciji s masenom spektrometrijom (GC-MS).



Slika 11. Ukupna ionska struja (TIC) pokazuje glavne organske spojeve u uzorcima propolisa prikupljenih iz (a) Enemor, (b) Holleta, (c) Bako i (d) gedo u Etiopiji

Kemijski sastav različitih uzoraka propolisa s različitih područja iz Etiopije očito se razlikuju, a to se može uočiti na slici 11. Također, kemijski sastav uzoraka propolisa pokazuje kako je propolis potencijalan izvor prirodnih bioaktivnih tvari za biološke i farmakološke primjene.

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Materijali i metode

3.1.1. Biljni materijali

Propolis je smolna smjesa koje pčele prikupljaju s pupoljaka i lišća raznih biljaka te ga oplemenjuju vlastitim enzimima. Pčelama propolis služi za krpanje pukotinama na košnicama, dok ga ljudi koriste u razne ljekovite svrhe. Geografsko porijeklo propolisa je područje Dalmacije.



Slika 12. Sirovi propolis

Cvjetni prah ili peludna zrnca podrazumijevaju muške spolne stanice mnogih biljaka koje pčele skupljaju tijekom leta oko raznih biljaka. U kombinaciji s nektarom i slinom pčela nastaju zrnca cvjetnog praha. Cvjetni prah opskrbljuje pčele s važnim hranjivim tvarima i prije svega je važan za uzgoj ličinki. Ljudi ga također koriste u ljekovite svrhe.



Slika 13. Cvjetni prah

3.1.2. Dobivanje ekstrakata

Ekstrakti propolisa i cvjetnog praha dobiveni su ekstrakcijama u otapalima:

• vodena otopina 96%-tnog etanola u omjerima etanola i vode:

- EtOH/H₂O = 50/50
- EtOH/H₂O = 70/30
- EtOH/H₂O = 80/20

• *n*-heksan

• diklormetan

• voda

Pri reakcijskim uvjetima, uz intenzivno miješanje:

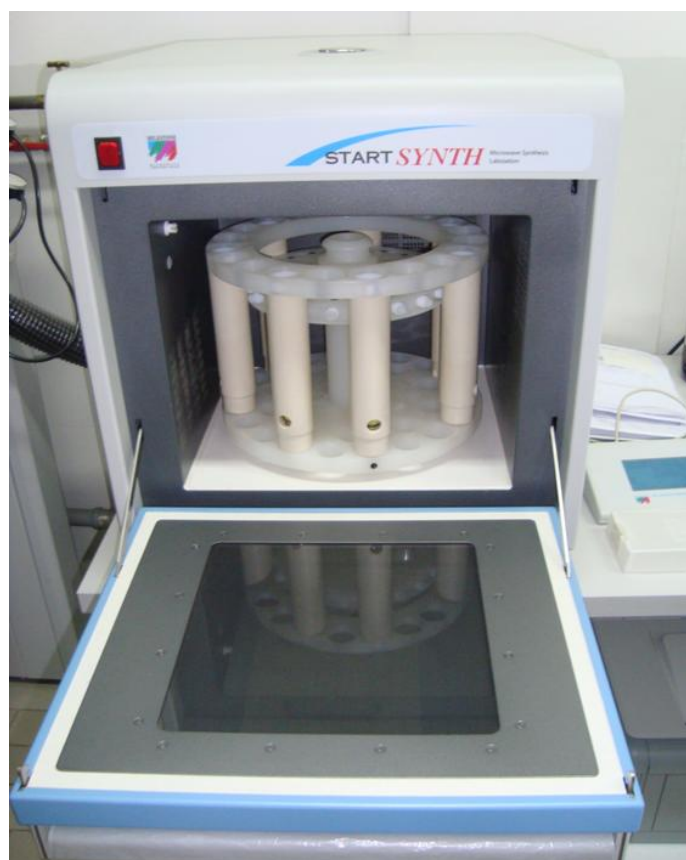
- sobna temperatura, u trajanju od 2h ili 24h
- temperatura refluksa, u trajanja od 2h ili 24h
- ozračivanjem mikrovalnim valovima, u trajanju od 15min, pri T=120°C, p= 40bar, P= 400 W
- destilacija vodenom parom, u trajanju od 2h



Slika 14. Aparatura za provedbu reakcije pri sobnoj temperaturi (lijevo) i aparatura za refluks (desno)



Slika 15. Aparatura za destilacijom vodenom parom



Slika 16. Reaktor s mikrovalnim zračenjem

Zatim su otopine ili destilat uparene do suha pod sniženim tlakom u rotavaporu.



Slika 17. Rotavapor

3.1.3. Određivanje sastava ekstrakata spregnutom tehnikom plinska kromatografija-masena spektrometrija

Uzorci ekstrakata propolisa prvotno su reakcijom esterifikacije prevedeni u odgovarajuće estere. Nakon derivatizacije 1 μL otopine injektiran je u plinski kromatograf s masenim detektorom Shimadzu GC-MS Ultra Gas Chromatograph Mass Spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Korištena je nepolarna kolona InertCap 1MS (GL Sciences) 0,25mm x 30m x 0,25 μm punjena 100% dimetilpolisiloksanom.



Slika 18. Plinski kromatograf s masenim detektorom Shimadzu GC-MS Ultra Gas Chromatograph Mass Spectrometer(Shimadzu, Kyoto, Japan)

Uvjeti rada plinskog kromatografa:

- Temperatura injektora: 250°C
- Način injektiranja: Split (80:1)
- Plin nosioc: Helij
- Temperaturni program: 100°C/2min
100 - 280°C - 5°C/15 min
280- 320°C - 10°C/20min

Uvjeti rada masenog detektora:

- Temperatura GC/MS sučelje: 280°C
- Temperatura ionskog izvora: 250°C
- Raspon omjera masa/naboj: 35-500 m/z
- Odgoda snimanja 5,0 min („solvent delay“)

3.1.4. Određivanje ukupnih fenola u ekstraktima propolisa

Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijski mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini od 725 nm. Metoda se bazira na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibdene kiseline, a pri oksidaciji fenolnih spojeva ove kiseline reduciraju se u wolfram-oksidi i molibden-oksidi koji su plavo obojeni.

Radna otopina:

- ekstrakta propolisa, c= 1 mg/mL u 96%-tnom etanolu

Standarda galne kiseline, c=1 mg/ml u 96%-tnom etanolu

Iz radne otopine standarda galne kiseline pripremljeni su standardi koncentracija 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL. U svaki standard i uzorak dodano je 20 µL 10%-tnog Folin-Ciocalteu reagensa te se promiješalo u pipeti 10 sekundi i ostavilo 30 minuta na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi. Zatim se dodalo 80 µL 7,5%-tne vodene otopine natrijeva

karbonata i vortexa i ostavilo 2 sata na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi. Sva mjerenja rađena su u triplicatu, a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata galne kiseline (mg GAE).

3.1.5. Određivanje antioksidativnih svojstava

Antioksidativna svojstva određena su DPPH metodom, odnosno metodom gašenja DPPH• radikala doniranim atomom vodika od strane potencijalnog antioksidansa. Gašenje DPPH• radikala možemo primjetiti prema promijeni boje otopine iz ljubičaste u žutu (slika 19.)



Slika 19. Promjena boje otopine pri doniranju vodikovog atoma sa strane antioksidansa DPPH• radikalu

Radne otopine:

- ekstrakta propolisa, c= 4 do 8 mg/mL u 96%-tnom etanolu
- DPPH, $c_{\text{DPPH}} = 200 \mu\text{mol/mL}$ u 96%-tnom etanolu

Mjerenje se izvodi koristeći višekanalni čitač mikrotitarskih pločica (ELISA, bio-tek instruments inc.) s automatskim miješanjem i snimanjem podataka na računalu. U 50 μL ekstrakata propolisa različitih koncentracija dodano je 50 μL DPPH ($c_{\text{DPPH}} = 200 \mu\text{mol/mL}$) i ostavljeno je 30 minuta na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi. Koncentracija DPPH je ista u svakom uzorku i iznosi 100 $\mu\text{mol/mL}$. Promjena apsorbancije očitana je na ELISA čitaču

na 517nm. 96%-tni etanol uzet je kao slijepa proba, a trolox kao pozitivna kontrola. Rezultati su izraženi kao IC_{50} , odnosno kao koncentracija antioksidansa koja uzrokuje 50% inhibicije DPPH. Niža vrijednost IC_{50} predstavlja veću efikasnost antioksidansa. Postotak inhibicije DPPH radikala računa se prema izrazu 3.1.. Sva mjerenja rađena su u tripлетu.

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

(3.1.)

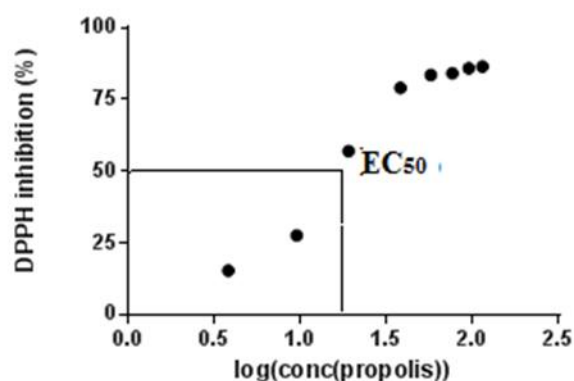
Gdje je:

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

$A_{A(t)}$ = apsorbancija reakcijske smjese nakon $t = 30$ minuta



Slika 20 . ELISA čitač. bio-tek instruments inc.



Slika 21. Grafičko određivanje IC₅₀

Na slici 21. Prikazano je grafičko određivanje IC₅₀. Postotak inhibicije DPPH se postavi na ordinatu, a log koncentracije propolisa na apcisu, te se dovije krivula s oblika. Iz krivulje se odredi koncentracija potrebna da se inhibira 50% DPPH.

3.2. Rezultati

Cilj istraživanja u okviru ovog rada bio je:

- Zaključivanje koja je od navedenih metoda ekstrakcije najbolja, odnosno otapanjem u kojem otapalu će se najviše komponenta propolisa i cvjetnog praha otopiti te pri kojim reakcijskim uvjetima,
- Istraživanje antioksidacijskih svojstava dobivenih ekstrakata, te
- Određivanje sastava dobivenih ekstrakata.

3.2.1. Propolis

Spregnutom analizom plinska kromatografija-masena spektroskopija ekstrakata propolisa identificirano je 7 kemijskih spojeva pomoću vanjskog standarda (Tablica 11.). Vanjski standard se sastoji od:

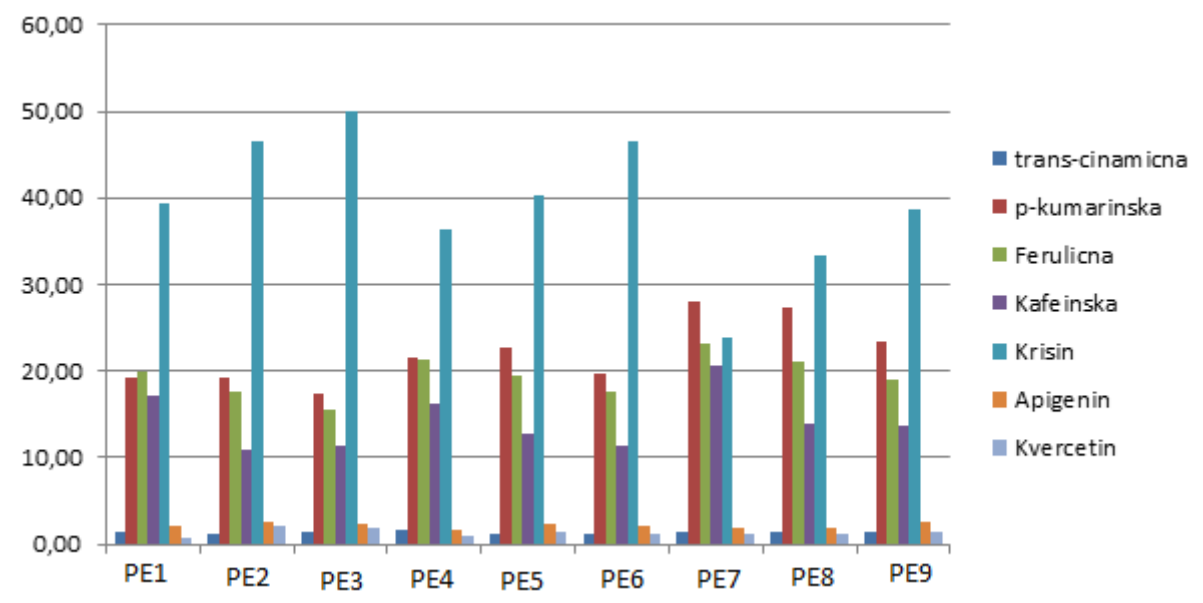
- trans-cinamične kiseline
- p-kumarinske kiseline
- ferulične kiseline
- kafeinske kiseline
- apigenina
- kvercetina

u koncentraciji od 100µg/ml.

Rezultati su izraženi u postocima s obzirom na identificirane spojeve.

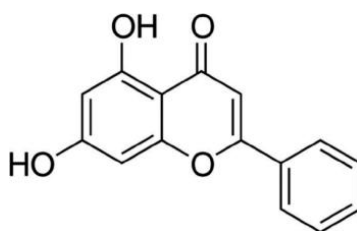
Tablica 6 . Postoci identificiranih spojeva u uzorcima ekstrakata propolis

	EP1	EP2	EP3	EP4	EP5	EP6	EP7	EP8	EP9
<i>trans</i> -Cinamična k.	1,44	1,11	1,36	1,73	1,13	1,29	1,37	1,45	1,32
<i>p</i> -Kumarinska k.	19,27	19,19	17,48	21,65	22,61	19,73	28,02	27,35	23,35
Ferulična k.	19,90	17,57	15,47	21,34	19,50	17,68	23,14	21,01	18,99
Kafeinska k.	17,09	10,96	11,45	16,33	12,75	11,44	20,55	13,89	13,70
Krisin k.	39,41	46,53	49,98	36,37	40,19	46,53	23,90	33,35	38,70
Apigenin k.	2,07	2,57	2,45	1,66	2,36	2,04	1,81	1,85	2,51
Kvercetin k.	0,82	2,08	1,81	0,92	1,46	1,29	1,22	1,10	1,43



Slika 22. Grafički prikaz postotaka identificiranih spojeva u uzorcima ekstrakata propolisa

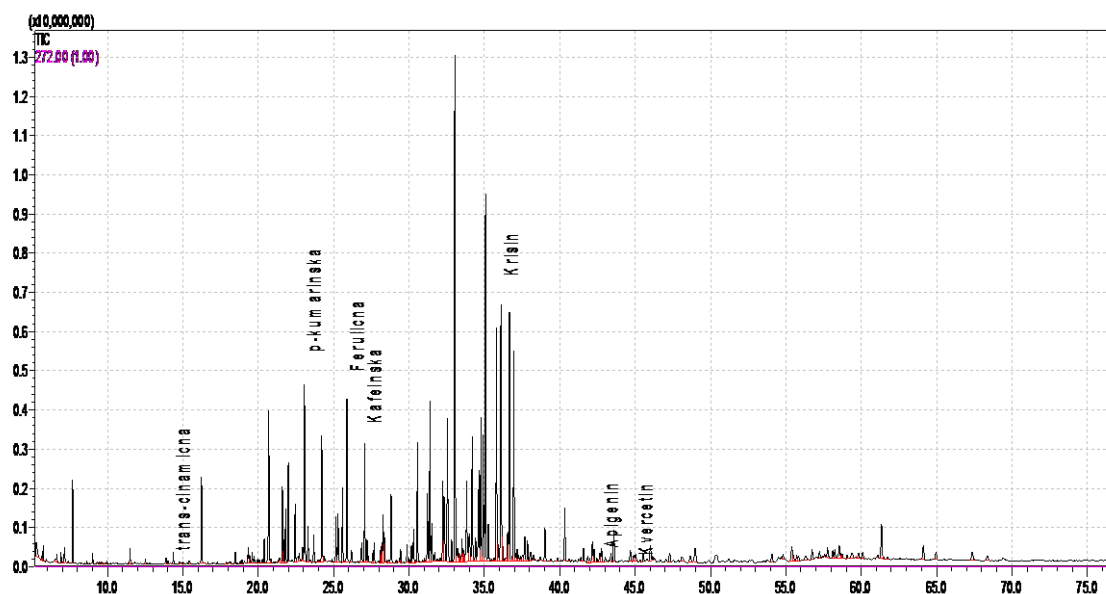
Kemijski sastav devet etanolnih ekstrakata propolisa određen je plinskom kromatografijom sa masenim detektorom. Rezultati su prikazani u Tablici 6. Te su grafički prikazani na slici 22. Omjer između pojedinih fenolnih spojeva u ekstraktima je različit i mijenja se ovisno o metodi ekstrakcije i udjelu etanola. Kemijski spoj koji je prisutan u najvećem postotku u svakom od ispitivanih ekstrakata je krisin (slika 23.).



Slika 23. Krisin

Krisin je prirodni flavonoid koji se derivira iz biljke *Passiflora incarnatae*, te je pronađen u značajnoj mjeri u pčelinjem propolisu i upeludi. Može ga se naći u manjim količinama i u pčelinjim košnicama, gdje pored drugih flavonoida ima velika antibakterijska svojstva za pčelinju zajednicu. *Passiflora incarnatae* (passion flower) u narodu je znana kao krunica, kolokvijalnog nazivlja: čokot strasti, cvijet pet rana itd. Prirodno stanište *passiflora*

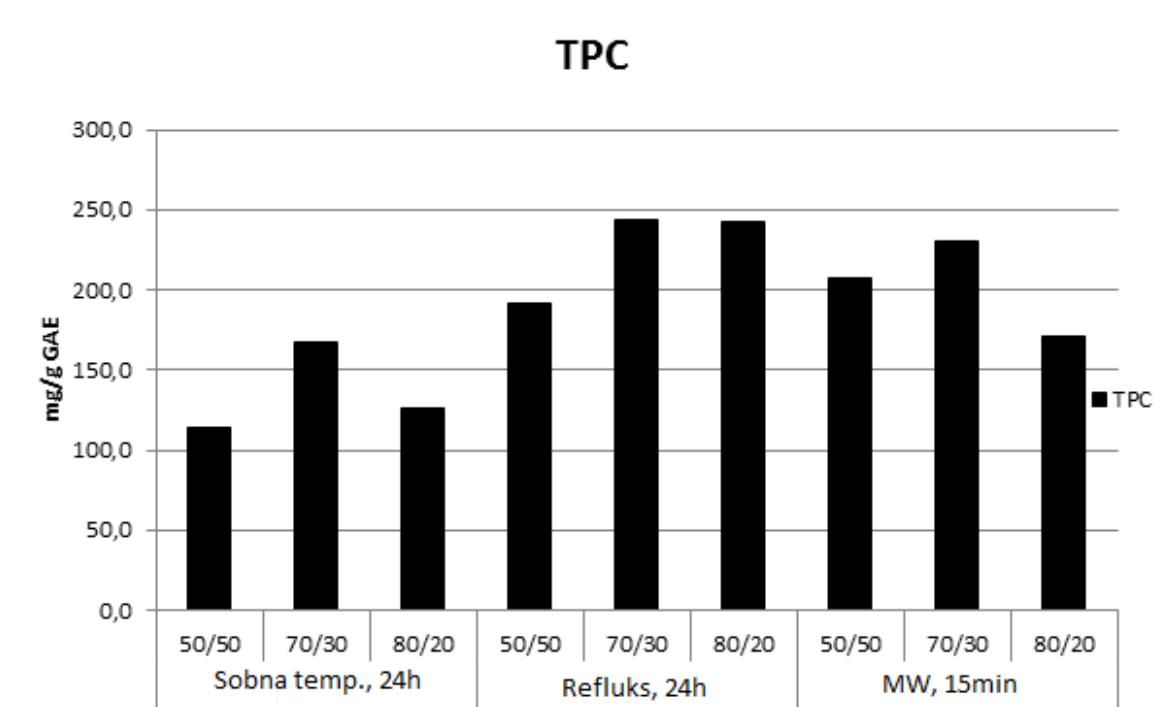
incarnatae jug SAD – a. Otkako je donesena u Europu u 17. st., kod nas raste u primorju, Istri, Dalmaciji i po otocima.



Slika 24. Maseni spektar dobiven plinskom kromatografijom sa masenim detektorom

Vidljivo je da se njegov udio povećava s povećanjem udjela etanola. Također krisin je jaki antioksidant te s povećanjem njegovog udjela u ekstraktima imamo bolja antioksidativna svojstva (manji IC_{50}).

Također, prisutan je i veliki udio hidroksi derivata cinamične kiseline, ferulična, kafeinska i p-kumarinske kiseline, koju su poznati antioksidativni agensi. Njihov udio u ekstraktima povećava se što je manji udio etanola u ekstraktima.

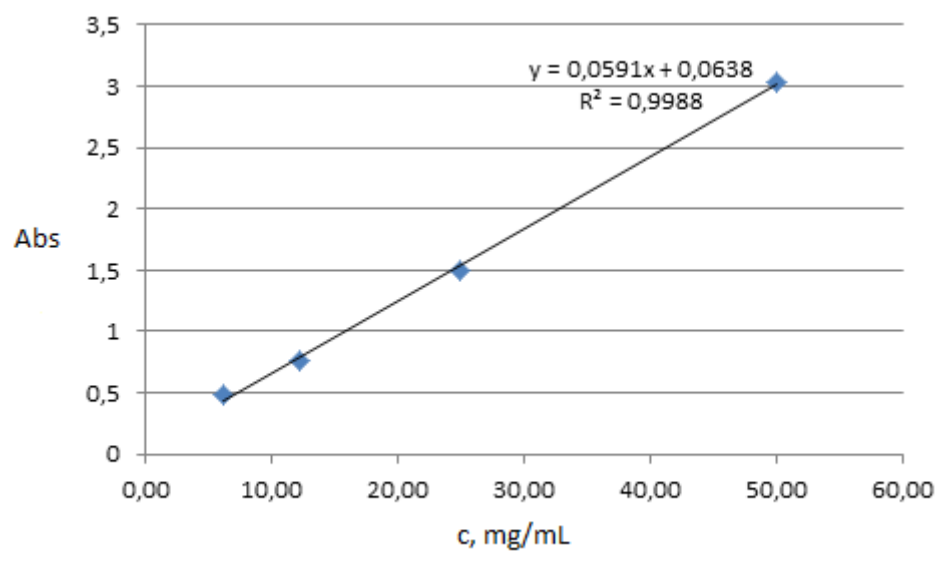


Slika 25. Grafički prikaz ukupnih fenola određenih Folin-Ciocalteu metodom, prikazanih kao ekvivalent galne kiseline

Na slici 25. Možemo uočiti kako u ekstraktima dobivenim ekstrakcijom u vodenj otropini etanola omjera, EtOH/H₂O=70/30, pri refluksu u trajanju od 24h i ozračivanju mikrovalnim zračenjem u trajanju od 15 minuta, imamo najviše ekvivalenata galne kiseline, odnosno dokazano je najviše polifenola. U tablici 7. i na slici 26. možemo uočiti kako absorbancija proporcionalno raste s porastom koncentracije ekvivalenta galne kiseline u uzorku.

Tablica 7. Promjena absorbancije po promjeni koncentracije galne kiseline po mililitru uzorka

c, µg GAE/ mL	Abs GAE
50,00	3,037
25,00	1,501
12,25	0,761
6,25	0,478

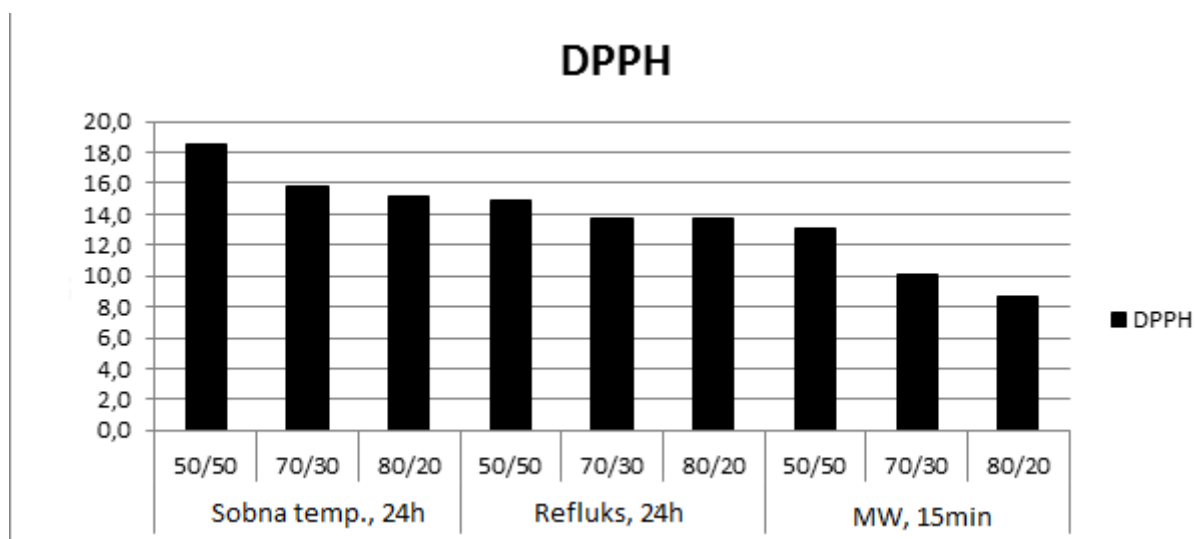


Slika 26. Grafički prikaz promjena absorbancije po promjeni koncentracije galne kiseline po mililitru uzorka (standardna krivulja)

Tablica 8. Prikaz ukupnih fenola i IC₅₀ u etanolnim ekstraktima propolisa

Ekstrakt	Omjer EtOH/H ₂ O	Ukupni fenoli mgGAE/gPE	DPPH IC ₅₀ µg/mL
1, 24h sobna Tem.	50/50	113,91±8,57	18,54±5,62
2, 24h sobna Tem.	70/30	167,89±13,28	15,74±1,40
3, 24h sobna Tem.	80/20	126,44±2,64	15,11±1,34
4, 24h refluks	50/50	192,17±18,62	14,95±1,23
5, 24h refluks	70/30	243,89±4,06	13,78±3,43
6, 24h refluks	80/20	242,91±8,75	13,71±2,26
7, 15min MW	50/50	207,39±1,51	13,08±0,25
8, 15min MW	70/30	230,74±19,31	10,09±2,74
9, 15min MW	80/20	171,03±5,89	8,61±2,10
10, 2h refluks	50/50	102,61±4,83	21,74±2,25
11, 2h refluks	70/30	197,19±3,08	7,37±3,15
12, 2h refluks	80/20	161,86±7,72	8,29±3,15

U tablici 8. Prikazani su ukupni fenoli kao mg ekvivalenta galne kiseline po gramu ekstrakta propolisa. Pošto je ekspreiment rađen u tripletima prikazana je srednja vrijednost i njena standardna devijacija. U tablici 8. Također je prikazana srednja vrijednost IC_{50} i standardna devijacija. Može se uočiti kako ekstrakt 11 koji je dobiven u vodenoj otopini etanola omjera, EtOH/H₂O=70/30, pri temperaturi refluksa u trajanju od 2h ima dosta ukupnih fenola te najniži IC_{50} , odnosno najučinkovitiji je antioksidans.



Slika 27. Grafički prikaz IC_{50}

Na slici 27. Prikazan je grafički prikaz IC_{50} za ekstrakte od 1 do 9. Najbolji antioksidans je ekstrakt dobiven u vodenoj otopini etanola, EtOH/H₂O=80/20, ozračen mikrovalnim valovima u trajanju od 15min (ekstrakt 9).

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Opće napomene

Reakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem provedene su u Milestone Start S mikrovalnoj pećnici opremljenoj pyrex (1 bar) ili kvarcnim posudama (40 bar).

Za ekstrakciju proplisa korištenisu 96%tni etanol, *n*-heksan i diklormetan posebne čistoće (p.a) standardnih dobavljača (Carlo Erba, Kemika, Aldrich).

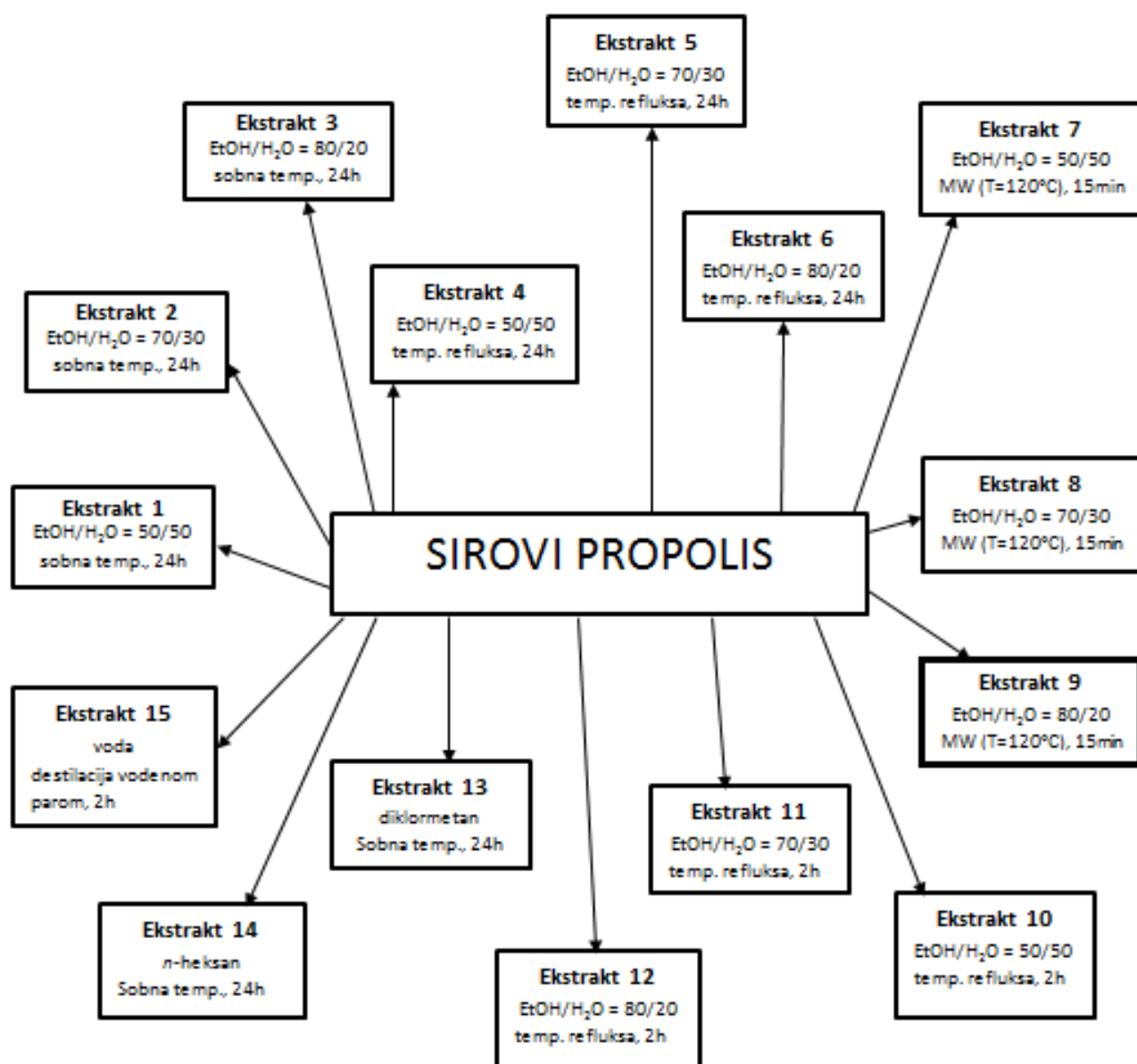
Reakcije su provedene standardnim metodama organske sinteze.

Otopine ili destilati uparene su do suha pod sniženim tlakom u rotavaporu Büchi.

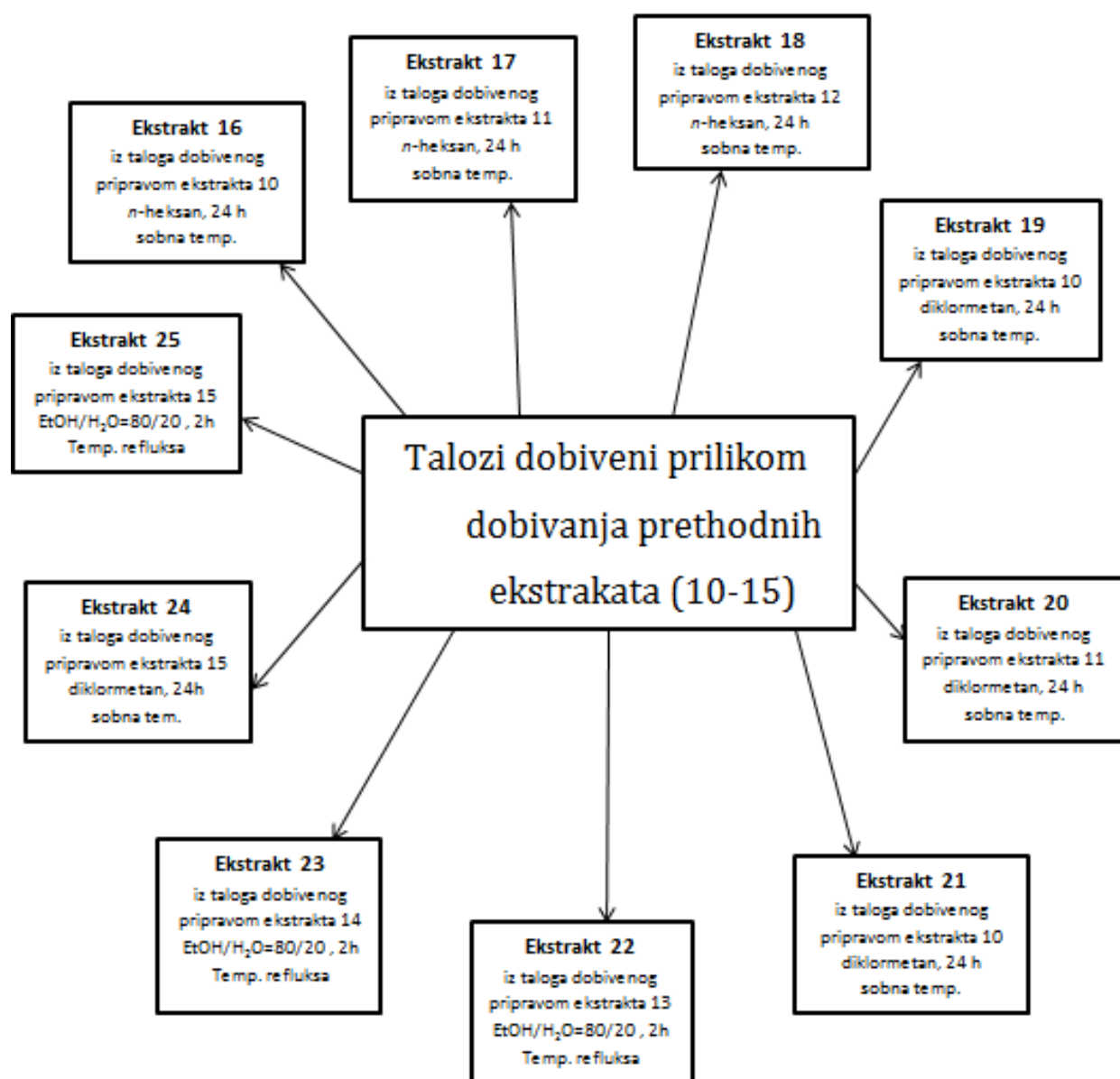
Maseni spektri snimani su na plinskom kromatografu s masenim detektorom Shimadzu GC-MS Ultra Gas Chromatograph Mass Spectrometer.

Antioksidativna svojstva određena su DPPH metodom.

1.2. Ekstrakcija propolisa



Shema 1. Ekstrakti dobiveni ekstrakcijom sirovog propolisa (ekstrakt 1-ekstrakt 15)



Shema 2. ekstrakti dobiveni ekstrakcijom taloga dobivenih prilikom dobivanja prethodnih ekstrakata (ekstrakt 16-ekstrakt 25)

4.2.1. Dobivanje ekstrakta 1

U okruglu tikvicu stavi se 0,500 g propolisa te se doda 10 mL 96%-tnog etanola i 10 mL vode ($\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O} = 50/50$). Reakcijska smjesa miješa se 24h na sobnoj temperaturi. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,247 g (iskorištenje = 49,40%) tamno žutog ulja.

4.2.2. Dobivanje ekstrakta 2

U okruglu tikvicu stavi se 0,500g propolisa te se doda 14mL 96%-tnog etanola i 6mL vode ($\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}=70/30$). Reakcijska smjesa miješa se 24h na sobnoj temperaturi. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,329g (iskorištenje= 65,80%) tamno žutog ulja.

4.2.3. Dobivanje ekstrakta 3

U okruglu tikvicu stavi se 0,500g propolisa te se doda 16mL 96%-tnog etanola i 4mL vode ($\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}=80/20$). Reakcijska smjesa miješa se 24h na sobnoj temperaturi. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,389g (iskorištenje= 77,80%) tamno žutog ulja.

4.2.4. Dobivanje ekstrakta 4

U okruglu tikvicu stavi se 0,500g propolisa te se doda 10mL 96%-tnog etanola i 10mL vode ($\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}=50/50$). Reakcijska smjesa miješa se 24h na temperaturi refluksa. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,268g (iskorištenje= 53,60%) tamno žutog ulja.

4.2.5. Dobivanje ekstrakta 5

U okruglu tikvicu stavi se 0,500g propolisa te se doda 14mL 96%-tnog etanola i 6mL vode ($\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}=70/30$). Reakcijska smjesa miješa se 24h na temperaturi refluksa. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,333g (iskorištenje= 66,60%) tamno žutog ulja.

4.2.6.Dobivanje ekstrakta 6

U okruglu tikvicu stavi se 0,500g propolisa te se doda 16mL 96%-tnog etanola i 4mL vode (EtOH/H₂O=80/20). Reakcijska smjesa miješa se 24h na temperaturi refluksa. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,327g (iskorištenje= 65,40%) tamno žutog ulja.

4.2.7.Dobivanje ekstrakta 7

U kivetu se stavi 0,500g propolisa te se doda 5mL 96%-tnog etanola i 5mL vode (EtOH/H₂O=50/50). Reakcijska smjesa ozračava se 15min mikrovalnim zračenjem pri temperaturi od 120°C. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,149g (iskorištenje= 29,80%) tamno žutog ulja.

4.2.8.Dobivanje ekstrakta 8

U kivetu se stavi 0,500g propolisa te se doda 7mL 96%-tnog etanola i 3mL vode (EtOH/H₂O=70/30). Reakcijska smjesa ozračava se 15min mikrovalnim zračenjem pri temperaturi od 120°C. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,249g (iskorištenje= 49,80%) tamno žutog ulja.

4.2.9.Dobivanje ekstrakta 9

U kivetu se stavi 0,500g propolisa te se doda 8mL 96%-tnog etanola i 2mL vode (EtOH/H₂O=80/20). Reakcijska smjesa ozračava se 15min mikrovalnim zračenjem pri temperaturi od 120°C. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,281g (iskorištenje= 56,20%) tamno žutog ulja.

4.2.10.Dobivanje ekstrakta 10

U okruglu tikvicu stavi se 0,500g propolisa te se doda 10mL 96%-tnog etanola i 10mL vode (EtOH/H₂O=50/50). Reakcijska smjesa miješa se 2h na temperaturi refluksa. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,300g (iskorištenje= 60,00%) tamno žutog ulja.

4.2.11.Dobivanje ekstrakta 11

U okruglu tikvicu stavi se 0,500g propolisa te se doda 14mL 96%-tnog etanola i 6mL vode (EtOH/H₂O=70/30). Reakcijska smjesa miješa se 2h na temperaturi refluksa. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,328g (iskorištenje= 65,60%) tamno žutog ulja.

4.2.12.Dobivanje ekstrakta 12

U okruglu tikvicu stavi se 0,500g propolisa te se doda 16mL 96%-tnog etanola i 4mL vode (EtOH/H₂O=80/20). Reakcijska smjesa miješa se 2h na temperaturi refluksa. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,346g (iskorištenje= 69,20%) tamno žutog ulja.

4.2.13.Dobivanje ekstrakta 13

U okruglu tikvicu stavi se 0,500g propolisa te se doda 20mL diklormetana. Reakcijska smjesa miješa se 24h na sobnoj temperaturi. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,376g (iskorištenje=75,20%) tamno žutog ulja.

4.2.14.Dobivanje ekstrakta 14

U okruglu tikvicu stavi se 0,500g propolisa te se doda 20mL *n*-heksana. Reakcijska smjesa miješa se 24h na sobnoj temperaturi. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,110g (iskorištenje=22,00%) tamno žutog ulja.

4.2.15. Dobivanje ekstrakta 15

U okruglu tikvicu stavi se 2,00 g propolisa te se doda 100mL vode i spoji na aparaturu za destilaciju vodenom parom. Reakcijska smjesa destilira se 2h. Destilat se profiltrira, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,041g (iskorištenje= 2,05%) svjetlo žutog ulja.

4.2.16. Dobivanje ekstrakta 16

U okruglu tikvicu stavi se 0,074g taloga dobivenog prilikom dobivanja ekstrakta 10 te se doda 10mL *n*-heksana. Reakcijska smjesa miješa se 24h na sobnoj temperaturi. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,043g (iskorištenje= 58,10%) tamno žutog ulja.

4.2.17. Dobivanje ekstrakta 17

U okruglu tikvicu stavi se 0,060g taloga dobivenog prilikom dobivanja ekstrakta 11 te se doda 10mL *n*-heksana. Reakcijska smjesa miješa se 24h na sobnoj temperaturi. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,017g (iskorištenje= 28,31%) tamno žutog ulja.

4.2.18. Dobivanje ekstrakta 18

U okruglu tikvicu stavi se 0,056g taloga dobivenog prilikom dobivanja ekstrakta 12 te se doda 10mL *n*-heksana. Reakcijska smjesa miješa se 24h na sobnoj temperaturi. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,043g (iskorištenje= 76,78%) tamno žutog ulja.

4.2.19. Dobivanje ekstrakta 19

U okruglu tikvicu stavi se 0,069g taloga dobivenog prilikom dobivanja ekstrakta 10 te se doda 10mL diklormetana. Reakcijska smjesa miješa se 24h na sobnoj temperaturi. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,034g (iskorištenje= 52,17%) tamno žutog ulja.

4.2.20. Dobivanje ekstrakta 20

U okruglu tikvicu stavi se 0,059g taloga dobivenog prilikom dobivanja ekstrakta 11 te se doda 10mL diklormetana. Reakcijska smjesa miješa se 24h na sobnoj temperaturi. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,047g (iskorištenje= 79,66%) tamno žutog ulja.

4.2.21. Dobivanje ekstrakta 21

U okruglu tikvicu stavi se 0,058g taloga dobivenog prilikom dobivanja ekstrakta 12 te se doda 10mL diklormetana. Reakcijska smjesa miješa se 24h na sobnoj temperaturi. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,030g (iskorištenje= 51,72%) tamno žutog ulja.

4.2.22.Dobivanje ekstrakta 22

U okruglu tikvicu stavi se 0,121g taloga dobivenog iz ekstrakta 13 te se doda 16mL 96%-tnog etanola i 4mL vode ($\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}=80/20$). Reakcijska smjesa miješa se 2h na temperaturi refluksa. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,051g (iskorištenje= 42,15%) tamno žutog ulja.

4.2.23.Dobivanje ekstrakta 23

U okruglu tikvicu stavi se 0,365g taloga dobivenog iz ekstrakta 14 te se doda 16mL 96%-tnog etanola i 4mL vode ($\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}=80/20$). Reakcijska smjesa miješa se 2h na temperaturi refluksa. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,237g (iskorištenje= 64,93%) tamno žutog ulja.

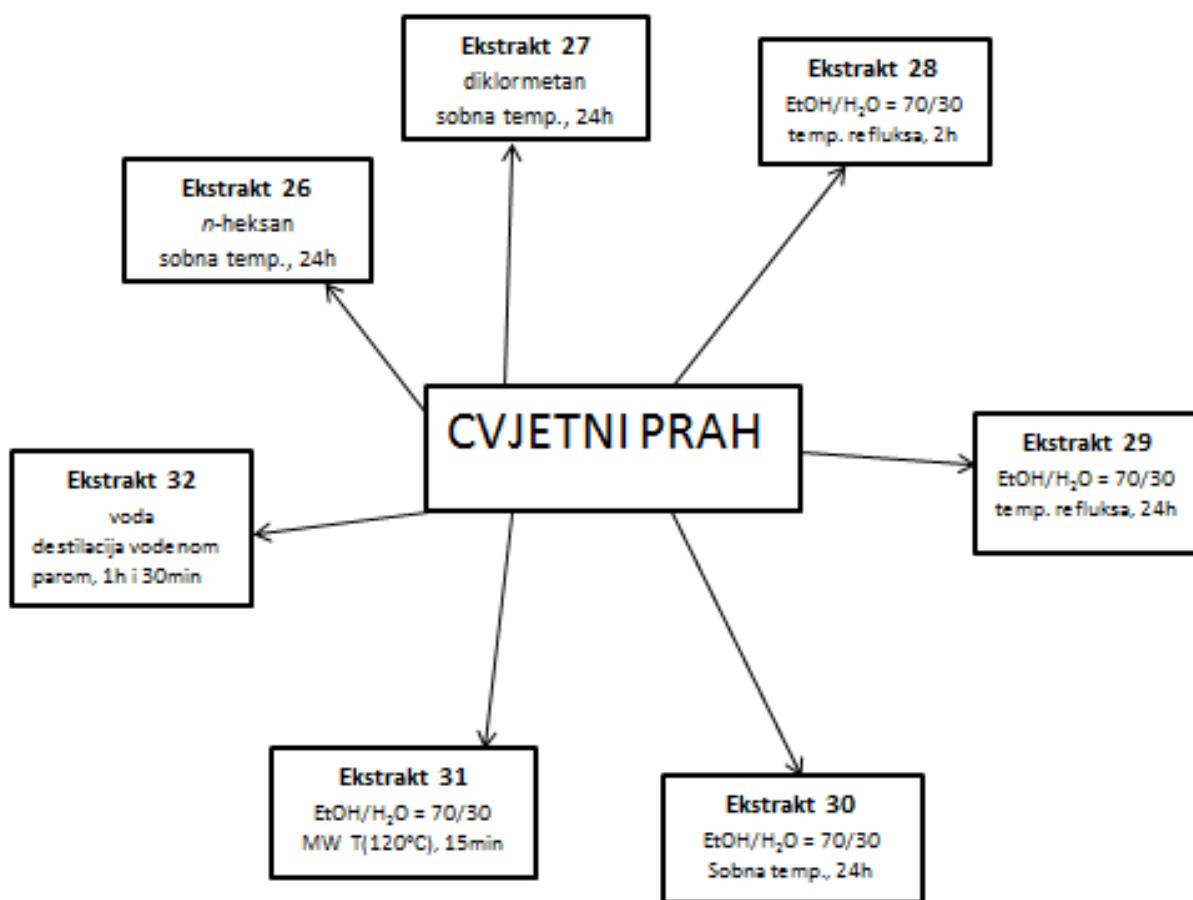
4.2.24.Dobivanje ekstrakta 24

U okruglu tikvicu stavi se 0,800g taloga dobivenog iz ekstrakta 15 te se doda 20mL diklormetana. Reakcijska smjesa miješa se 24h na sobnoj temperaturi. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,076g (iskorištenje= 9,50%) tamno žutog ulja.

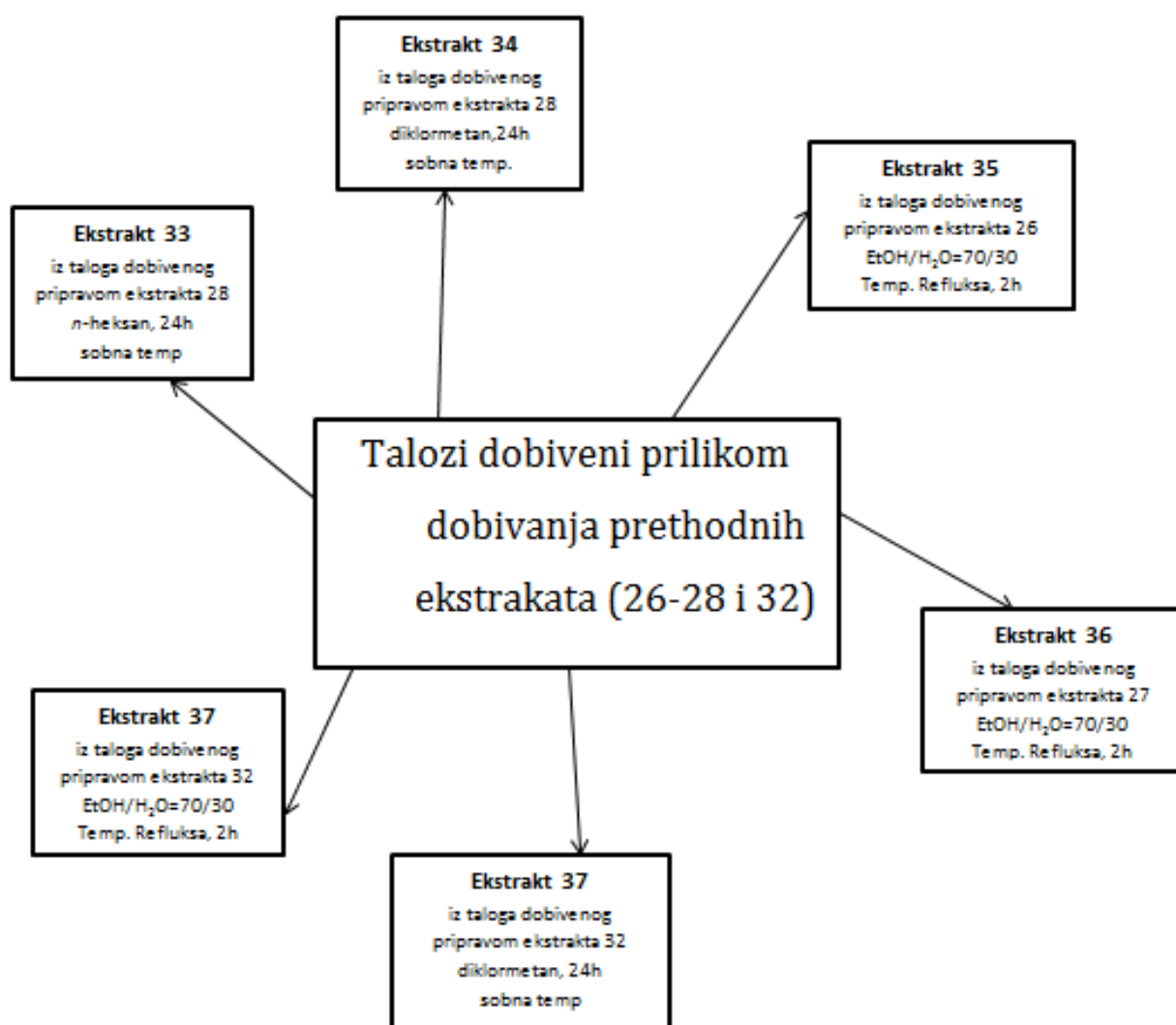
4.2.25.Dobivanje ekstrakta 25

U okruglu tikvicu stavi se 0,720g taloga dobivenog iz ekstrakta 15 te se doda 16mL 96%-tnog etanola i 4mL vode ($\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}=80/20$). Reakcijska smjesa miješa se 2h na temperaturi refluksa. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,314g (iskorištenje= 43,61%) tamno žutog ulja.

1.3. Ekstrakcija cvjetnog praha



Shema 3. Ekstrakti dobiveni ekstrakcijom cvjetnog praha (ekstrakt 26 - ekstrakt 32)



Shema 4. Ekstrakti dobiveni ekstrakcijom taloga dobivenih prilikom dobivanja ekstrakata cvjetnog praha (ekstrakt 33-ekstrakt 36)

4.3.1.Dobivanje ekstrakta 26

U okruglu tikvicu stavi se 0,500g cvjetnog praha te se doda 20mL *n*-heksana. Reakcijska smjesa miješa se 24h na sobnoj temperaturi. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,028g (iskorištenje= 5,60%) tamno žutog ulja.

4.3.2.Dobivanje ekstrakta 27

U okruglu tikvicu stavi se 0,500g cvjetnog praha te se doda 20mL diklormetana. Reakcijska smjesa miješa se 24h na sobnoj temperaturi. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,038g (iskorištenje= 7,60%) tamno žutog ulja.

4.3.3.Dobivanje ekstrakta 28

U okruglu tikvicu stavi se 0,500g cvjetnog praha te se doda 14mL 96%-tnog etanola i 6mL vode (EtOH/H₂O=70/30). Reakcijska smjesa miješa se 2h na temperaturi refluksa. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,259g (iskorištenje= 51,80%) tamno žutog ulja.

4.3.4.Dobivanje ekstrakta 29

U okruglu tikvicu stavi se 0,500g cvjetnog praha te se doda 14mL 96%-tnog etanola i 6mL vode (EtOH/H₂O=70/30). Reakcijska smjesa miješa se 24h na temperaturi refluksa. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,224g (iskorištenje= 44,80%) tamno žutog ulja.

4.3.3.Dobivanje ekstrakta 30

U okruglu tikvicu stavi se 0,500g cvjetnog praha te se doda 14mL 96%-tnog etanola i 6mL vode (EtOH/H₂O=70/30). Reakcijska smjesa miješa se 24h na sobnoj temperaturi. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,193g (iskorištenje= 38,60%) tamno žutog ulja.

4.3.4.Dobivanje ekstrakta 31

U dvije kivete se stavi po 0,235g cvjetnog praha (ukupno 0,470g) te se doda 7mL 96%-tnog etanola i 3mL vode (EtOH/H₂O=70/30) u svaku od kiveta. Reakcijske smjese ozračavaju se 15min mikrovalnim zračenjem pri temperaturi od 120°C. Profiltriraju se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,424g (iskorištenje= 90,21%) tamno žutog ulja.

4.3.5.Dobivanje ekstrakta 32

U okruglu tikvicu stavi se 2,00 g cvjetnog praha te se doda 100mL vode i spoji na aparaturu za destilaciju vodenom parom. Reakcijska smjesa destilira se 1h i 30min. Destilat se profiltrira, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,010g (iskorištenje= 0,50%) svjetlo žutog ulja.

4.3.6.Dobivanje ekstrakta 33

U okruglu tikvicu stavi se 0,101g taloga dobivenog prilikom dobivanja ekstrakta 28 te se doda 20mL *n*-heksana. Reakcijska smjesa miješa se 24h na sobnoj temperaturi. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,043g (iskorištenje= 42,57%) tamno žutog ulja.

4.3.7.Dobivanje ekstrakta 34

U okruglu tikvicu stavi se 0,104g taloga dobivenog prilikom dobivanja ekstrakta 28 te se doda 20mL diklormetana. Reakcijska smjesa miješa se 24h na sobnoj temperaturi. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,013g (iskorištenje= 12,50%) tamno žutog ulja.

4.2.8.Dobivanje ekstrakta 35

U okruglu tikvicu stavi se 0,406g taloga dobivenog prilikom dobivanja ekstrakta 26 te se doda 14mL 96%-tnog etanola i 6mL vode (EtOH/H₂O=70/30). Reakcijska smjesa miješa se 2h na temperaturi refluksa. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,228g (iskorištenje= 56,26%) tamno žutog ulja.

4.2.9.Dobivanje ekstrakta 36

U okruglu tikvicu stavi se 0,395g taloga dobivenog prilikom dobivanja ekstrakta 26 te se doda 14mL 96%-tnog etanola i 6mL vode (EtOH/H₂O=70/30). Reakcijska smjesa miješa se 2h na temperaturi refluksa. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,199g (iskorištenje=50,38%) tamno žutog ulja.

4.2.10. Dobivanje ekstrakta 37

U okruglu tikvicu stavi se 0,361g taloga dobivenog prilikom dobivanja ekstrakta 32 te se doda 20mL diklormetana. Reakcijska smjesa miješa se 24h na sobnoj temperaturi. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,058g (iskorištenje=16,07%) tamno žutog ulja

4.2.11. Dobivanje ekstrakta 38

U okruglu tikvicu stavi se 0,363g taloga dobivenog prilikom dobivanja ekstrakta 32 te se doda 14mL 96%-tnog etanola i 6mL vode (EtOH/H₂O=70/30). Reakcijska smjesa miješa se 2h na temperaturi refluksa. Profiltrira se, a filtrat se upari pod sniženim tlakom do suha te se dobije 0,301g (iskorištenje=82,92%) tamno žutog ulja

5. ZAKLJUČAK

- Cilj ovog rada bio je istražiti najbolju metodu ekstrakcije, odnosno najpogodnije otapalo i reakcijske uvjete, kojom bi se razdvojile komponente koje su najviše bioaktivne, odnosno koje pokazuju najbolja antioksidativna svojstva.
- Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako bi najbolji izbor bio ekstrakcija propolisa u vodenoj otopini etanola u omjeru 70/30 pri temperaturi refluksa u trajanju od 2h
- Iz navedenoga također možemo zaključiti kako je propolis liofilan te da se najbolje otapa u etanolu.
- Važno je naglasiti kako u slučaju predugog trajanja reakcije vjerojatno dolazi do razgradnje nekih bioaktivnih spojeva i zbog toga su reakcije pri temperaturi refluksa u trajanju od 24h pokazale nešto slabije rezultate.
- U slikama i tablicama koje su prikazane u rezultatima i raspravi također se može uočiti kako ekstrakt s najviše polifenola nema u isto vrijeme i najmanju vrijednost IC_{50} , odnosno nije najbolji antioksidans. Iz toga se može zaključiti kako nisu ipak sve vrste polifenola dobri antioksidansi.

6. LITERATURA

1. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Propolis>
2. <https://www.youtube.com/watch?v=nNs2Qtq9wX8>
3. <https://en.wikipedia.org/wiki/Polyphenol>
4. <https://en.wikipedia.org/wiki/Antioxidant>
5. F.A. Santos, E.M.A. Bastos, M. Uzeda, M.A.R. Carvalho, L.M. Farias, E.S.A. Moreira, F.C. Braga, *Journal of Ethnopharmacology***80** (2002) 1 -7.
6. Soley ARSLAN, Sibel SİLİCİ, Duygu PERCİN, Ayşe Nedret KOC, Ozgur ER, *Turk J Biol***36** (2012) 65-73
7. R. Thirugnanasampandan, Sayana Beena Raveendran, R. Jayakumar, *Asian Pac J Trop Biomed***8**(2012) 651-654
8. Soraia I. Falcão, Nuno Vale, Paula Gomes, Maria R. M. Domingues, Cristina Freire, Susana M. Cardoso and Miguel Vilas-Boasa, *Published online in Wiley Online Library*(2012),
- 9 Tanja Petelinc, Tomaz Polak, Lea Demsar, Polona Jamnik, *PLoS ONE***2**(2013) 1-8
- 10 Soraia I. Falcão, Andreia Tomás, Nuno Vale, Paula Gomes, Cristina Freire, Miguel Vilas-Boasa, *Industrial Crops and Products***49** (2013) 805– 812
- 11 Pattaraporn Boonsai, Preecha Phuwapraisirisan, Chanpen Chanchao, *International Journal of Medical Sciences* **11** (2014)327-336
- 12 Ahmed I Rushdi, Nuru Adgaba, Noofal I M Bayaqoob, Ahmed Al-Khazim, Bernd R T Simoneit, Aarif H El-Mubarak and Khalid F Al-Mutlaq, *Rushdi et al. SpringerPlus***3**(2014) 253

7. ŽIVOTOPIS

Ivana Zorić rođena je 6. studenog 1992. godine u Dubrovniku. Osnovnu školu pohađala je u Osnovnoj školi Župa dubrovačka. 2008. godine upisala je Gimnaziju Dubrovnik i završila 2012. godine. Zatim je upisala fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer kemijsko inženjerstvo. Stručnu praksu obavila je u PLIVA d.o.o.