

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ



Бобан Д. Анђелковић

**Примена резултата NMR и FTIR
спектроскопских техника у
мултиваријантној анализи за
класификацију прополиса**

Докторска дисертација

Београд, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Boban D. Anđelković

**The application of NMR and FTIR
spectroscopic techniques results in the
multivariate data analysis for propolis
classification**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Ментори:

Др Веле Тешевић, ванредни професор
Хемијски факултет, Универзитет у Београду

Др Дејан Гођевац, научни саветник
НУ ИХТМ–Центар за хемију, Универзитет у
Београду

Чланови комисије:

Др Слободан Милосављевић, професор емеритус
Хемијски факултет, Универзитет у Београду,
дописни члан САНУ

Др Влатка Вајс, научни саветник
НУ ИХТМ–Центар за хемију, Универзитет у
Београду

Др Љубодраг Вујисић, доцент
Хемијски факултет, Универзитет у Београду

Датум одбране докторске дисертације:

Захвалница

Иако ова дисертација носи име једног аутора (моје маленкости), она је угледала светлост дана, пре свега, захваљујући тимском раду колега лабораторије Центра за Инструменталну Анализу, али и сарадника из других лабораторија и институција. Стога је ред, макар овде, да поменем све оне који су томе допринели. Наравно, први међу једнакима су мој ментор, професор др Веле Пешевевић као и професор др Слободан Милосављевић и професорка др Влатка Вајс, који су ме својим саветима, подршком и помоћи са много стрпљења водили утабаном стазом до циља пред којим се сада налазим. Раме уз раме са њима стоје и остали чланови ЦИА тима. Пју су, пре свих, коментор на овом докторату (научни отац) др Дејан Гођевац, затим др Љубодраг Вујисић и др Милка Јадранин који су ме увели у свет аналитичких метода још за време мог дипломског рада, као и Марина Подосијевић, др Иван Вучковић, др Мирослав Новаковић (Ковачевић ☺), др Ирис Ђорђевић, др Ивана Аљанчић, др Нина Подоровић, др Борис Мандић, др Снежана Трифуновић, Дејан Вучетић и Ивана Лоуре спремни да помогну у свакој ситуацији. Никако не смем заборавити некадашње чланове лабораторије мр Даницу Бајић, Драгицу Павличевић, др Снежану Бајић, Маријану Живковић и Неду Ђорђевић. И наравно, ту су младе наде, сараднице, уједно и докторанти, Гордана Крстић, Јована Станковић, Мирјана Цветковић и Ивана Софренић, „саборци на бојном пољу” уз чију помоћ ни по 10-12 сати рада у лабораторији не пада тешко. Велику зашвалност дугујем и професору др Веселину Маслаку и др Александри Митровић за синтезу неопходних стандарда, као и др Марини Соковић и др Шањи Стевић за анализе антимикробне активности. За што мање штампарских грешака у првој верзији текста, поред већ поменуте Иване Софренић, своју несебичну помоћ пружила је и докторант Драгана Стојков. За прикупљање смола пупољака најзаслужнији су др Саша Орловић и др Бранислав Прудић, колеге са Института за тополарство и низијско шумарство из Новог Сада.

Наравно, ништа од овога не би било могуће без безусловне подршке и помоћи моје породице којима дугујем највећу захвалност.

Finally I owe the greatest gratitude to all VERIFIN personnel, especially to Marja-Leena Kuitunen and Marja-Leena Rapinoja, Prof. Dr. Paula Vanninen, the director of VERIFIN, for knowledge, support and guidance during six months fellowship period at Institute VERIFIN, University of Helsinki.

Above all, I am most grateful to Dr. Harri Koskela, the VERIFIN NMR laboratory manager. It was real pleasure and priviledge to work with him and to learn from such a genuine NMR expert.

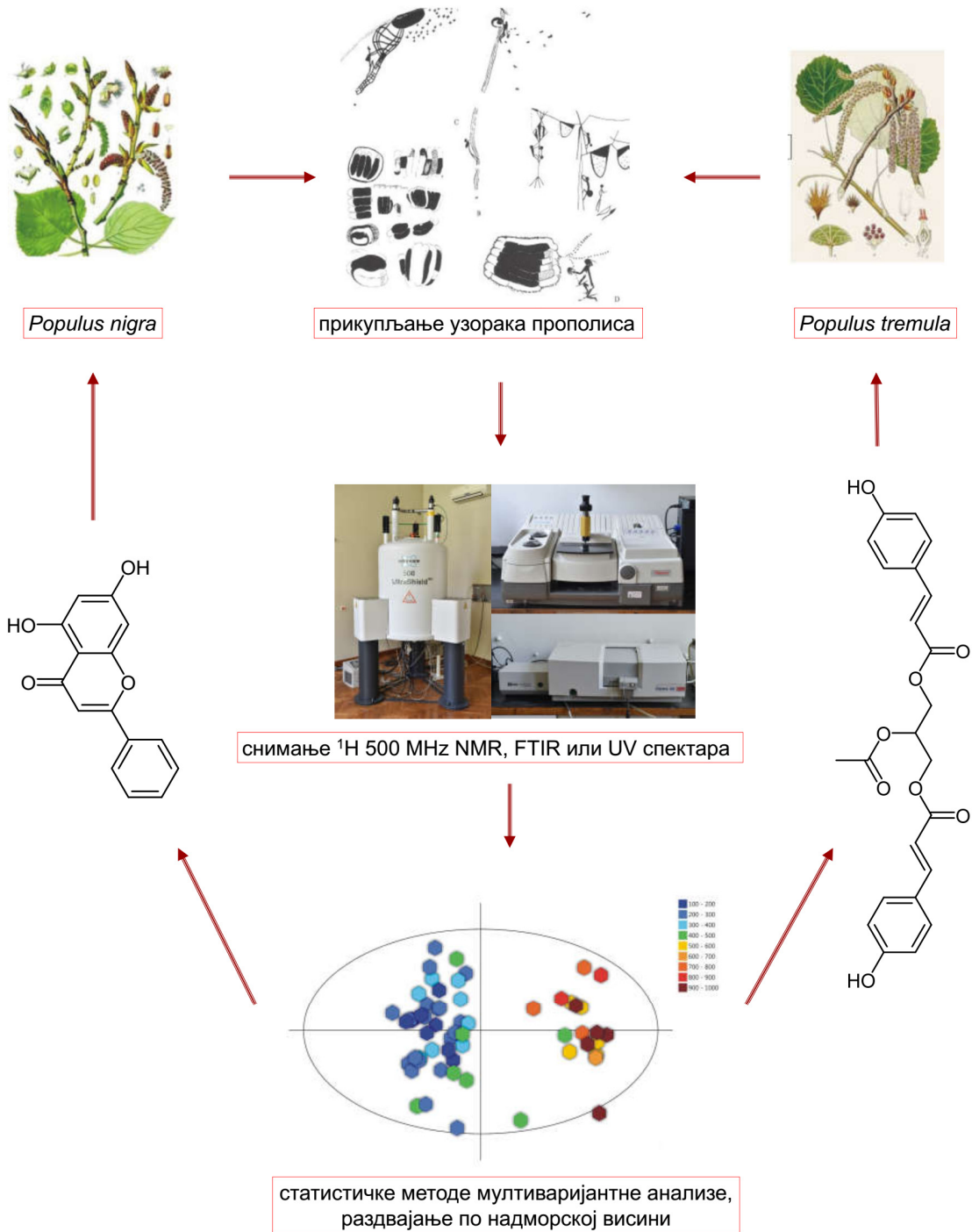
У Београду

12.11.2017. године

Аутор

Овај текст посвећујем: Душану, Алекси, Даници, Уроши и мојој мајци

Графички извод



Извод

У овом раду су приказане брзе и једноставне спектроскопске методе за одређивање хемијског састава прополиса типа топола са подручја Србије, Босне и Херцеговине и Бугарске коришћењем метаболомичког приступа. У циљу корелисања разлика у хемијском саставу прополиса топола типа са надморском висином са које су узорци прикупљени, коришћени су резултати NMR, IR и UV спектроскопских техника у комбинацији са PCA и OPLS статистичким методама. Ботаничко порекло прополиса је утврђено поређењем спектралних података узорка прополиса са спектралним подацима фенолних смола пупољака различитих врста топола које расту у близини локација са којих су узорци прикупљени. За корелисање две матрице (табеле) спектралних података коришћена је O2PLS метода. На основу примењених статистичких анализа (PCA, OPLS и O2PLS), главне компоненте у узорцима прополиса прикупљеним у регији умерено-континенталне климе на надморској висини изнад 500 m су ацетил глицерил естри фенолних киселина са пупољака *Populus tremula*. Флавоноиди фенолних смола пупољака врста *P. nigra* и *P. x euramericana* су најзаступљенији у узорцима прополиса прикупљеним на надморској висини испод 400 m. Узорци прикупљени на надморској висини између 400 и 500 m садрже све поменуте секундарне метаболите топола у различитим односима.

Применом OPLS-DA методе на спектралне податке узорци прополиса типа топола су класификовани у две класе назване Планински прополис типа топола и Равничарски прополис типа топола.

Антимикробна активност прикупљених узорка је тестирана на Грам-позитивним бактеријским сојевима *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), клиничком изолату *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus* (ATCC 10240) и *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), Грам-негативним бактеријама *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Escherichia coli* (ATCC 35210) и хуманом изолату *Enterobacter cloacae* и на гљиви *Fusarium oxysporum*. Резултати антимикробних тестова показали су високу антимикробну активност прополиса према свим испитиваним микроорганизмима.

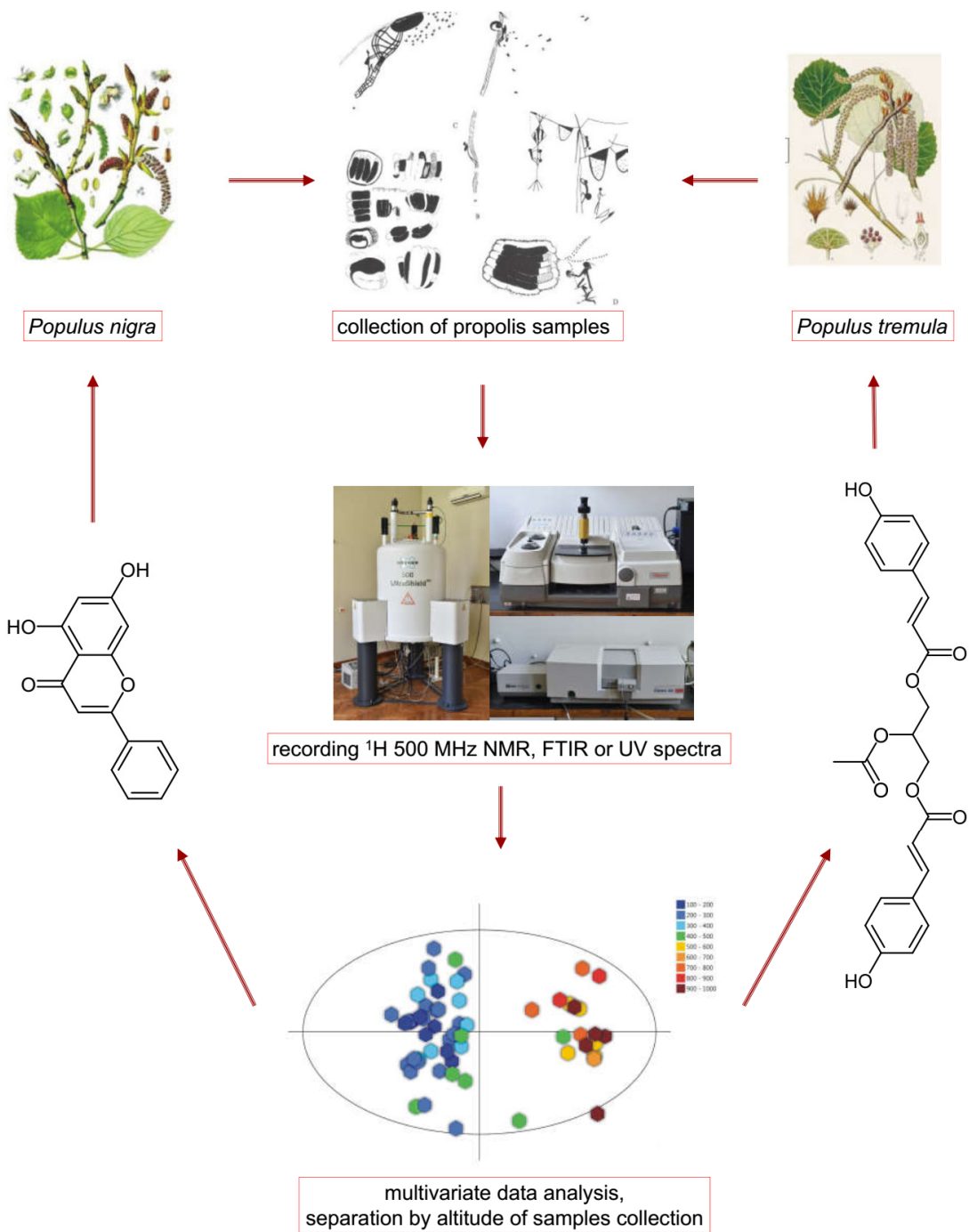
Кључне речи: Прополис, NMR, FTIR, UV, OPLS-DA, O2PLS, метаболомика, антимикробна активност.

Научна област: Хемија

Ужа научна област: Органска хемија

УДК број: 547

Graphical abstract



Abstract

Here we have presented simple, fast and rapid spectroscopic methods for determination of the chemical composition of Poplar type propolis from Serbia, Bosnia and Herzegovina and Bulgaria, using metabolomics approach. The main objective was to correlate variability in Poplar type propolis composition with the altitude of its collection. This was carried out using NMR, IR, and UV spectroscopy followed by PCA and OPLS methods. The botanical origin of the propolis was established by comparing spectral data of propolis with those of various *Populus* species growing close to the collection site. An O2PLS method was utilized to integrate two blocks of data. According to PCA, OPLS and O2PLS, the major compounds in propolis samples, collected from temperate continental climate above 500 m, were phenolic glycerides originating from *Populus tremula* buds. Flavonoids were predominant in propolis samples collected below 400 m, originating from *P. nigra* and *P. x euramericana* buds. Samples collected at 400 – 500 m were of mixed origin with variable amount of all detected metabolites.

Using OPLS-DA method and spectral data, poplar propolis samples were classified in two classes named Mountain populus type and Flatland populus type.

Antimicrobial activity of propolis samples was tested on *Gram*-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), clinical isolates of *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus* (ATCC 10240) and *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), *Gram*-negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Escherichia coli* (ATCC 35210), and human isolate of *Enterobacter cloacae*, on fungus *Fusarium oxysporum*. The results of antimicrobial tests showed strong antimicrobial activity of propolis against all tested microorganisms.

Keywords: Propolis, NMR, FTIR, UV, OPLS-DA, O2PLS, metabolomics, antimicrobial activity.

Academic Expertise: Chemistry

Field of Academic Expertise: Organic chemistry

UDK: 547

Sadržaj

1 UVOD.....	3
2 OPŠTI DEO.....	4
2.1 Medonosna pčela – <i>Apis mellifera</i>	5
2.2 Propolis: dobijanje, prikupljanje, podela i značaj	7
2.2.1 Dobijanje propolisa	7
2.2.2 Prikupljanje propolisa	8
2.2.3 Podela propolisa po geografskom i/ili floralnom poreklu.....	9
2.3 Biološko dejstvo i terapijski efekti propolisa	13
2.3.1 Antioksidativno dejstvo.....	13
2.3.2 Protivzapaljensko dejstvo.....	14
2.3.3 Imunomodulatorna aktivnost.....	15
2.3.1 Antimikrobna aktivnost.....	16
2.4 Primena statističkih metoda multivarijantne analize rezultata merenja u metabolomici	20
2.4.1 Priprema uzoraka za metabolomičku analizu.....	22
2.4.2 Obrada spektralnih podataka za multivarijantnu analizu	24
2.4.3 Parcijalna regresija najmanjih kvadrata i srodne metode koje se koriste u metabolomici.....	28
2.5 Analiza hemijskog sastava propolisa	31
2.5.1 Pregled izabranih referenci.....	32
3 EKSPERIMENTALNI DEO	36
3.1 Rastvarači i standardi	37
3.2 Prikupljanje uzoraka propolisa i pupoljaka topola	37
3.3 Reakcije hidrolize i derivatizacije	39
3.4 Hromatografske tehnike povezane sa masenom spektrometrijom	40
3.4.1 LC/MS.....	40
3.4.2 GC/MS	40
3.5 Spektroskopske tehnike.....	41
3.5.1 NMR spektroskopija	41
3.5.2 FTIR spektroskopija.....	42
3.5.3 UV-Vis spektroskopija.....	43
3.6 Statističke metode analize fenolnih smola propolisa i pupoljaka topola.....	43

3.7	Biološki testovi.....	43
3.7.1	Antimikrobna aktivnost etanolnih i propilenglikolnih ekstrakata	44
3.7.2	<i>In vitro</i> antifungalna aktivnost ekstrakata propolisa	45
4	NAŠI RADOVI	46
4.1	Analiza hemijskog sastava uzoraka propolisa i fenolnih smola pupoljaka	47
4.1.1	LC/MS analiza fenolnih komponenti smola dva tipa propolisa	47
4.1.2	Ekstrakcija i GC/MS analiza isparljivih organskih jedinjenja i organskih komponenti pčelinjeg voska iz propolisa	54
4.2	Primena rezultata NMR, FTIR i UV spektroskopskih tehnika u multivarijantnoj analizi propolisa	65
4.2.1	Promene hemijskog sastava propolisa u zavisnosti od nadmorske visine.....	73
4.2.2	Određivanje botaničkog porekla propolisa primenom O2PLS modela.....	84
4.2.3	Klasifikacija prikupljenih uzoraka propolisa.....	87
4.3	Antimikrobne aktivnosti.....	90
4.3.1	Antibakterijska aktivnost.....	90
4.3.2	Antifungalna aktivnost	92
5	Zaključak	95
6	LITERATURA	97
7	PRILOZI.....	107
8	Biografija.....	143

1 UVOD

Cilj ove doktorske disertacije bio je da se primenom instrumentalnih tehnika identifikuje što veći broj jedinjenja prisutnih u uzorcima propolisa, prikupljenim na teritoriji Republike Srbije, Bosne i Hercegovine i Bugarske, i da se multivarijantnim statističkim metodama uzorci sličnog hemijskog sastava grupišu u odgovarajuće klase. Pored toga, težište istraživanja bilo je usmereno ka pronalaženju markera klasifikacije, na određivanje njihovog floralnog poreklu i biološke aktivnosti.

U poglavlju Opšti deo dat je kraći osvrt na pčelinju zajednicu, način na koji ona funkcioniše, način prikupljanja propolisa, kao i njegovu ulogu u košnici. Pored toga, predstavljeni su odabrani literaturni podaci koji se bave sličnom tematikom. Pre svega, prikazana su dosadašnja dostignuća u oblasti analize hemijskog sastava, bioloških aktivnosti i floralnog porekla propolisa. Na kraju poglavlja predstavljene su statističke metode koje su korišćene pri obradi rezultata za potrebe ovog rada.

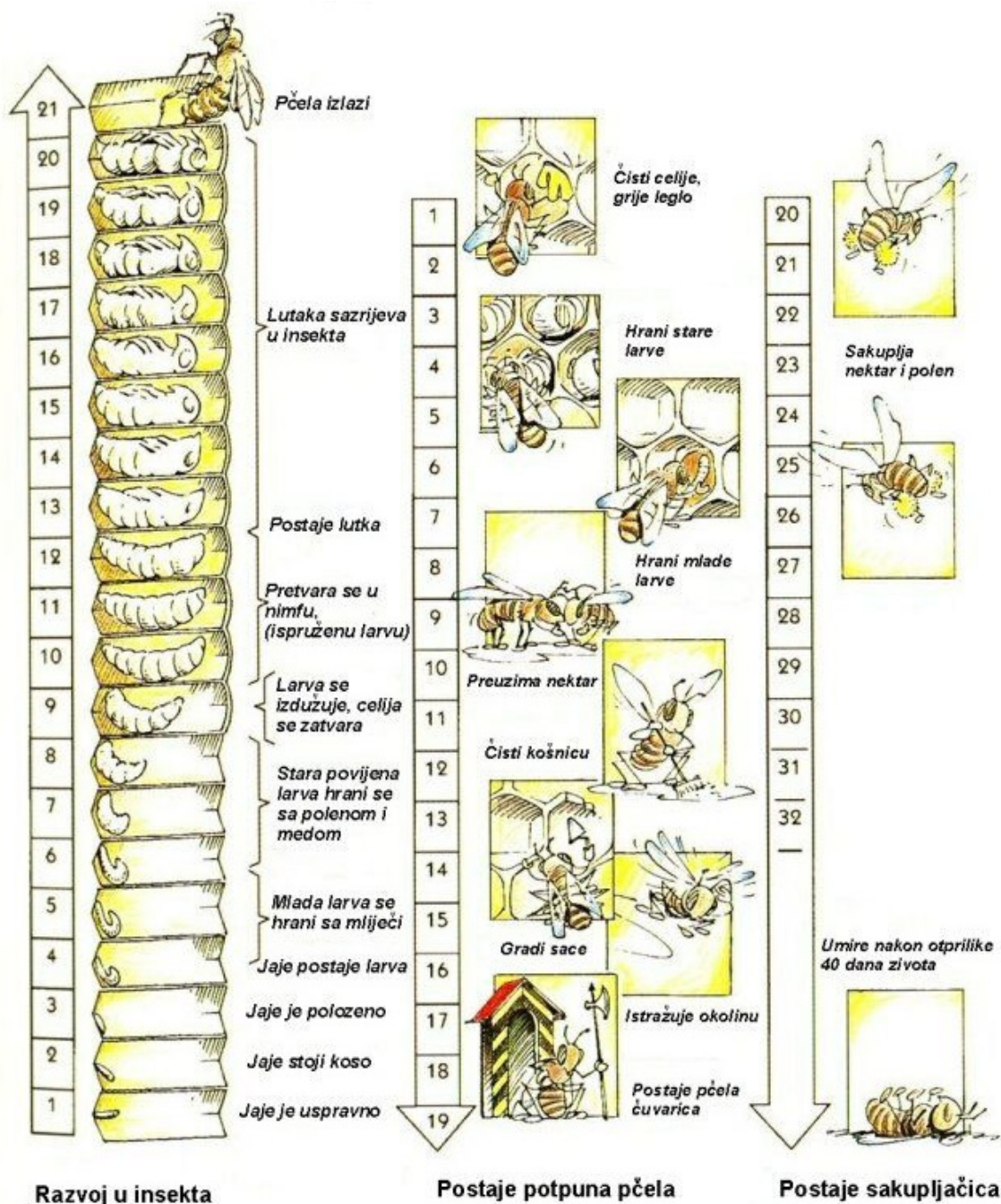
Eksperimentalni deo obuhvata informacije o načinu pripreme uzoraka za pojedine analize, kao i primenjenim statističkim metodama i biološkim testovima. U ovom poglavlju dati su detaljni parametri snimanja za svaku od primenjenih instrumentalnih tehnika.

U poglavlju Naši radovi opisan je postupak identifikacije jedinjenja prisutnih u uzorcima propolisa i tabelarno dat njihov pregled po instrumentalnim tehnikama koje su u tu svrhu korišćene. Prikazani su i rezultati multivarijantnih analiza u kombinaciji sa rezultatima spektroskopskih tehnika i na osnovu njih je izvršena klasifikacija propolisa. Na kraju poglavlja prikazani su rezultati antimikrobnih aktivnosti.

U Zaključku su prikazana najvažnija dostignuća proistekla iz ovog rada.

2 OPŠTI DEO

Razvoj i uloga pčela u različitim fazama života



1

¹ http://vrelo.ucoz.com/index/a_class_poljoprivreda_pcelarstvo_vrelo_portal_zabava/0-37

2.1 Medonosna pčela – *Apis mellifera*

Medonosna pčela (evropsko-afrička medonosna pčela), *Apis mellifera* pripada porodici Apidae, redu Hymenoptera (opnokrilci), podred Apocrita i rodu Apis. Jedna je od 11 poznatih vrsta pčela u svetu koje proizvode i skladište med. Samo četiri vrste pčela se tradicionalno gaje i to pre svega *A. mellifera*, *A. florea* (mala indijska pčela), *A. cerana* i *A. dorsata* (velika indijska pčela) (ref.). Australijski kontinent naseljavaju endemske vrste pčela podfamilije Apine. Jedan od pripadnika je vrsta *Tetragonula carbonaria* iz roda *Tetragonula* koja se takođe komercijalno koristi u proizvodnji meda. Zapadni Brazil naseljavaju pčele roda *Melipona* (*M. scutellaris*) koje, za razliku od ostalih, svoje kolonije prave u zemlji. Zanimljivo je da kod *T. carbonaria* i *M. scutellaris* žaoka sa otrovom nije razvijena kao kod domaće pčele [1, 2].

Pčele su socijalni insekti koji žive u kolonijama od po 20.000 - 30.000 jedinki sa jasno definisanim hijerarhijom i podjelom posla [3]. Jednu pčelinju zajednicu (društvo) čine: matica, trutovi i pčele radilice (Slika 1).



Slika 1. Činioci pčelinjeg društva: radilica (levo), trut (sredina) i matica (desno) [4].

Matica je jedina polno zrela ženka u pčelinjem društvu koja polaganjem jaja obezbeđuje opstanak društva, a putem feromona održava zajednicu na okupu. U svakom društvu može biti samo jedna matica, a ukoliko se desi da se izleže više njih, dolazi do podele društva rojenjem ili do sukoba i „tihe” smene matica gde najjača i najsposobnija opstaje. Tokom svog životnog ciklusa matica izlazi iz košnice samo jednom – pri parenju ili ako dođe do rojenja. Po oplodjenju, matica polaže jaja u ćelije saća izgrađene od voska i obložene propolisom. Iz najvećeg broja jaja legu se radilice, a iz ostatka

trutovi. U slučaju kada za tim ima potrebe iz nekoliko posebno uređenih ćelija saća legu se matice. Matica dnevno položi od 2.500 do 5.000 jaja.

Matica se od pčela radilica, osim po ulozi u košnici, razlikuje i po izgledu: mnogo je duža, trbušni deo tela je svetlijih boja (bronzana), noge su duže, a leđa bez dlačica. Matica na zadnjim nogama nema polenove korpice za odlaganje cvetnog praha, a oblik njene žaoke je drugačiji nego kod radilice.

Radilica je polno nerazvijena ženka pčele. Izleže se iz oplodjenih jaja uz potpunu metamorfozu (kao i matica i trut) praćenu stadijumima larve i lutke koja traje 21 dan. Ona obavlja sve poslove u pčelinjem društvu: hrani leglo, sakuplja nektar, cvetni prah (polen), proizvodi propolis, gradi saće, održava temperaturu i vlažnost vazduha u košnici, održava čistoću, brani košnicu od uljeza, hrani i neguje maticu, proizvodi med i mleč. Broj radilica u društvu je promenljiv i zavisi od vrste pčela, godišnjeg doba, plodnosti matice itd. Dužina života radilice je takođe promenljiva i najviše zavisi od godišnjeg doba.

Trut je polno razvijen mužjak i u jednoj košnici ih je od pet do šest stotina. Izuzetno, može ih biti i više hiljada. Leže se iz neoplođenih jaja tzv. devičanskim rađanjem (partenogeneza). Jedina životna uloga truta u pčelinjoj zajednici je oplodnja matice. Za razliku od ženki, trutovi ne poseduju žaoku već umesto nje imaju kopulativni organ [1].

U prirodi, pčele prave svoja gnezda u mračnom prostoru koji je zaštićen od spoljašnjih negativnih uticaja (toplota, hladnoća i vlaga), najčešće u šuplinama drveća i stena. Pčele koje slobodno žive u prirodi se ne razlikuju ni anatomski, ni morfološki, ni po instinktima od pčela koje uzgaja čovek. Jedina razlika je što gajenim pčelama čovek obezbeđuje zaštićen prostor – košnicu kojim upravlja manipulišući njihovim instinktima.

Prvi dokumentovani zapisi o eksploataciji pčela kao održivog i pouzdanog izvora hrane su pećinski crteži koju su nastali oko 13.000 godina pre nove ere [5]. Kroz istoriju, sve velike civilizacije su u svojoj kulturi imale posebno mesto za pčelu, pa je tako i dan danas.



Slika 2. Reprodukција pečinskog crteža (levo) i hijeroglifi iz Egipatskih piramida (desno) [5].

2.2 Propolis: dobijanje, prikupljanje, podela i značaj

2.2.1 Dobijanje propolisa

Pčelinja zajednica prikuplja cvetni nektar i fermentiše ga prevodeći složene šećere u proste. Radom svojih krila radilice uklanjaju višak vode iz nektara. Na taj način se dobija med – slatka lepljiva viskozna tečnost koju pčele skladište u ćelijama saća i zatvaraju voštanim poklopcima. Med predstavlja glavni izvor hrane za pčelinju zajednicu tokom čitave godine. Zbog sezonskih promena i dostupnosti nektara, pčele instinktivno proizvode i skladište rezerve meda. Osim meda, koji je za čoveka dominantan pčelinji proizvod i glavna asocijacija na pčelu, pčelinja društva proizvode i/ili prikupljaju propolis, polen, matični mleč i vosak.

Pčele proizvode propolis tako što prikupljaju fenolne smole biljaka (uglavnom sa pupoljaka), žvaću ih i mešaju sa voskom koji same proizvode. Prikupljanje i proizvodnja propolisa, kao i bilo koja druga aktivnost pčela van košnice, dešava se samo kada je mirno vreme bez vetra i kiše. Pčele mandibulama skidaju fenolne smole sa pupoljaka, pakuju ih i prenose u polenovim korpicama na zadnjem paru nogu [7]. Čitav proces traje 15 – 30 minuta, u proseku. U jednom naletu svaka pčela prikupi oko 10 mg smole. U košnici se smole mešaju sa voskom iz abdominalnih žlezda, pri čemu nastaje propolis.

Propolis pčelama u njihovoj zajednici služi kao gradivni materijal, izolator i sterilizator. Smatra da poreklo reči propolis potiče od složenice dveju grčkih reči: *pro* (ispred) i *polis* (grad), ili po drugoj verziji, od reči *propilos* koja znači zamazivati, gladiti. Uloga propolisa u pčelinjem društvu, kao i njegove lekovite osobine poznate su od davnina.

Analizom posmrtnih ostataka mumija iz Egipatskih piramida i hijeroglifa na zidovima grobnica (Slika 1) utvrđeno je da su sveštenici pri balsamovanju tela koristili smole na bazi propolisa 3.100 godina pre nove ere. Pisani tragovi o njegovom korišćenju se vrlo često sreću i u antičkim zapisima. Tako, Hipokrat ga spominje kao sredstvo za lečenje čireva, rana i modrica. Detaljan opis u svom delu „*De materia medica*” navodi i Diskordije; „žuta, lepljiva, mekana masa koja se lako širi i skuplja, prijatnog mirisa i kao sredstvo za uklanjanje trnja i bodlji”. Kod Rimljana prvi pisani trag o propolisu se sreće u delu „*Naturalis historia*” Plinija starijeg, a i te kako je bio poznat i kod Arabljana. Avicena, poznati arapski alhemičar toga doba navodi da postoje dve vrste propolisa, žuti i crni, kao i da žuti vremenom prelazi u crni. Koristio ga je, pre svega, u lečenju reume i ekcema [5].

2.2.2 Prikupljanje propolisa

Postoje dva opšta načina prikupljanja propolisa od strane čoveka. U zavisnosti od potreba i namera, prikupljanje može biti ekstenzivno i intenzivno. Kod ekstenzivnog pristupa propolis se, posle vrcanja meda, prikuplja kao sporedni proizvod gajenja pčela skidanjem sa drvenih ramova (satnih osnova) prilikom njihove pripreme za narednu pašu. Pri intenzivnoj proizvodnji pčelari koriste prirodni nagon pčela da propolisom popunjavaju pukotine i rupe unutar svog legla. U ovu svrhu najbolje rezultate daje primena mreža koje se postavljaju iznad satnih osnova, kao i korišćenje košnica sa širokim otvorom na ulazu u košnicu. U okviru pčelinjeg društva određeni broj radilica (tzv. pčele armirači) kao glavni zadatak ima održavanje higijene i proizvodnju propolisa. Pri intenzivnoj proizvodnji propolisa pčelinja zajednica se dodatno opterećuje jer se smanjuje broj pčela radilica koje prikupljaju nektar zarad proizvodnje propolisa, pa je samim tim smanjen i unos nektara, odnosno prinos meda [8, 9].



Slika 3. Prikupljanje propolisa iz košnica struganjem (levo) i mrežicom (desno) [8].

Prosečan prinos propolisa po košnici je oko 100 – 150 g, mada može biti i do 400 g u zavisnosti od flore, vremenskih uslova i jačine pčelinjeg društva.

2.2.3 Podela propolisa po geografskom i/ili floralnom poreklu

Primena propolisa u savremenoj pa i tradicionalnoj medicini umnogome zavisi od njegovog hemijskog sastava, koji je, pre svega, uslovljen floralnim poreklom. U načelu, postoji nekoliko osnovnih tipova i podtipova propolisa. U literaturi se sreću: brazilski zeleni i crveni, mediteranski, ruski propolis od breze, kubanski, propolis sa Pacifika, iz Afrike, Australije, propolis od topole itd. Biljno i geografsko poreklo, kao i glavne biološki aktivne komponente svakog od njih prikazani su u Tabeli 1 [10–25].

Tabela 1. Geografsko i botaničko poreklo propolisa, kao i dominantne bioaktivne komponente

Geografsko poreklo	Botaničko poreklo	Dominantne bioktivne komponente
Evropa, Severna Amerika, Novi Zeland i deo Azije (područja sa umereno-kontinentalnom klimom)	Biljke roda <i>Populus</i> spp. najviše <i>P. nigra</i>	Polifenoli: pinocembrin, pinobanksin, hrizin, galangin, kafena, ferulinska, cimetna kiselina i njihovi estri
Brazil	Zeleni propolis	Prenil estri fenilpropanoida, fenolne kiseline, prenil estar <i>p</i> -kumarinske kiseline, acetofenoni, diterpenske kiseline, kafeoilhina kiseline, kemferid, izosakuranetin i kemferol
	Crveni propolis	<i>Dalbergia ecataphjllum</i>
	Geopropolis	Biljke rodova <i>Myrtaceae</i> spp. i <i>Anacardiaceae</i> spp.
Rusija	Biljke roda <i>Betula</i> spp. Pre svih <i>B. verrucosa</i> , <i>B. pendula</i> i <i>B. pubescens</i>	Cimetna kiselina, fenilpropaniodi seskviterpenola, akacetin, apigenin, ermanin, ramnocitrin, kemferid i α -acetiksibetulenol
Kuba i Venecuela	Biljke roda <i>Clusia</i> spp. pre svega <i>C. rosea</i> i <i>C. minor</i>	Benzofenoski estri poliizoprenoidea: nemoroson, ksantocimol i gutiferon E
Švajcarska	<i>Populus tremula</i>	Benzilestar <i>p</i> -kumarinske kiseline, benzilestar ferulinske kiseline, kao i dikumaroil acetil glicerol estar, diferuloil acetil glicerol estar, feruloil kumaroil acetil glicerol i kafeoil kumaroil acetil glicerol

Geografsko poreklo	Botaničko poreklo	Dominantne bioktivne komponente	
Mediteran	Grčka	Najverovatnije biljke iz roda <i>Conifer</i> spp.	Flavonoidi i diterpenske kiseline: izokuperna, pimarinska i komuninska kiselina; izoagatadiol, agatadiol, feruginol, 8-elemen i totaral
	Malta	Biljke roda <i>Ferula</i> spp., najverovatnije <i>F. communis</i>	Diterpenske kiseline: izokuperna, pimarinska i imbrikatolična kiselina; kao i totarol i 13-epitorulosal
	Turska	Biljke rodova <i>Populus</i> spp. i <i>Eucalyptus</i> spp. Kao i <i>Castanea sativa</i>	Pinocembrin, pinobanksin, njihovi estri, prenil estri kafene kiseline, ferulinska kiselina, diterpenske kiseline: pimarinska, izopimarinska, abijetinska, dihidroabijetinska; cinamilcinamat, etiloleat, benzil cinamat, benzopiran i hrizin
	Alžir	Biljke rodova <i>Populus</i> spp. i <i>Cistus</i> spp.	Pinocembrin, pinobanksin, njihovi acetati, hrizin, galangin, pektolinarigenin, pilozin, ladanein, apigenin, naringenin, tektohrizin, metoksihrizin, prenilstar kafene kiseline, ferulinska kiselina, labdan i klerodan
Australija (<i>Apis mellifera</i> i <i>Tetragonula carbonaria</i>)	<i>Acacia paradoxa</i> i <i>Corymbia torliana</i>	Ksantoroel, pterostiblen, sakuranetin, pinostrobin, stilbeni, prenilistri tetrahidroksi stilbena, prenil estri cimetne kiseline, flavanoni, flavanoli i halkoni	
Pacifički region	Okinava, Havaji i Tajvan	<i>Macaranga tanarius</i>	Prenilestri flavonoida: izonimfeol-B, nimfeol-A, nimfeol-B, nimfeol-C, propolins i 3'-geranilnaringenin
	Indonezija i Mjanmar	<i>Mangifera indica</i>	Alkenilrezorcinoli, triterpeni cikloartenskog tipa, prenilistri flavonona

Geografsko poreklo		Botaničko poreklo	Dominantne bioktivne komponente
	Nigerija i Kenija	Najverovatnije <i>Canarium schweinfurthii</i>	Izoflavonoidi, prenilizoflavonoidi, stilbeni, triterpeni, tetrahidrojusticidin B, 6-metoksifilil, geranil estri stilbena i makarangin
Afrika	Kamerun, Kongo i Oman	<i>Azadirachta indica</i> , <i>Acacia</i> spp. i <i>Mangifera indica</i>	Triterpeni, derivati amirina i lupeola, diprenilflavonoidi, halkoni, kardanol, kardoli anakardinska kiselina
	Etiopija	Najverovatnije <i>Acacia</i> spp.	Triterpeni: acetilestri α - i β -amirina, lupeol i acetil estri α - i β -lupeola
Tajland		Drveće <i>Styrax</i>	Fenilalilflavononi, (<i>E</i>)-cinamil-(<i>E</i>)-cinamilidat
Kanarska ostrva		/	Furofuranski lignani

2.3 Biološko dejstvo i terapijski efekti propolisa

I pored višemilenijumske upotrebe propolisa u tradicionalnoj medicini, odsustvo standardizacije hemijskog sastava propolisa i njegove korelacije sa biološkom aktivnošću rezultovalo je nepostojanjem leka baziranog na propolisu. Iz tog razloga, svi proizvodi koji se mogu naći na tržištu su registrovani kao pomoćna lekovita sredstva. Ovde će biti pobrojani i ukratko opisani rezultati dosadašnjih istraživanja o antibiotskom, anti-gljivičnom, antivirusnom, antiupalnom, antioksidativnom, imunomodulatornom i anti-tumorskom dejstvu propolisa [17, 26].

2.3.1 Antioksidativno dejstvo

Konstantni izazovi spoljašnje sredine poput UV zračenja i toksina, kao i nusprodukti ćelijskog metabolizma, generišu reaktivne vrste kiseonika i azota (vodonik peroksid – H_2O_2 , superoksidni anjon – O_2^- , hidroksilni radikal – HO^\cdot i azotni oksid – NO) koje dovode do oksidativnih promena na malim molekulima i gradivnim blokovima ćelija (ugljeni hidrati, lipidi, proteini i nukleinske kiseline). U ekstremnim slučajevima krajnji rezultat su trajna i nepovratna oštećenja koja često uvode ćeliju u proces programirane ćelijske smrti (apoptoza) ili uzrokuju razvoj neurodegenerativnih i kardiovaskularnih oboljenja, kancera i dijabetesa [27–33].

Fenolne kiseline i flavonoidi (generalno, polifenoli) zahvaljujući svojoj strukturi su veoma snažni prirodni antioksidanti. Zaštitna uloga flavonoida u biološkim sistemima pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja („hvatanja”) elektrona slobodnog radikala, helatnog vezivanja jona prelaznih metala (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} i Mg^{2+}), aktiviranja antioksidativnih enzima i inhibiranja oksidaza [34–36]. Njihov antioksidativni kapacitet umnogome zavisi od broja i položaja hidroksilnih grupa. Na osnovu svojih istraživanja Kvesta-Rubio (Cuesta-Rubio) i saradnici su pokazali da je poliiizoprenovani benzofenon nemoroson glavni nosilac antioksidativne aktivnosti u kubanskom propolisu, i da se metilovanjem ovog jedinjenja antioksidativni kapacitet drastično smanjuje [37]. Peroksidacija i nitrovanje lipoproteina niske gustine (LDL) su

inhibirani u *in vitro* eksperimentu sa urugvajskim propolisom bogatim polifenolima. U svom radu Durdan (Durdane) i saradnici su dokazali da etanolni ekstrakt turskog propolisa deluje antioksidativno na tkivo jetre i inhibira reaktivne azotove vrste kod pacova [38].

I pored toga što je antioksidativna aktivnost propolisa najviše izučavana, još uvek ne postoji nijedna studija koja ukazuje kako se može odrediti i koja se doza propolisa preporučuje za ljudsku upotrebu.

2.3.2 Protivzapaljensko dejstvo

Zapaljenje ili inflamacija je složen kaskadni niz hemijskih signala i reakcija organizma izazvan imunim odgovorom na prisustvo stranog tela i/ili organizma ili povredom tkiva, kao i njegovim obnavljanjem [39]. Zapaljenje je dvostepeni proces. Prvu fazu predstavlja kratkotrajno (akutno) zapaljenje posredovano ćelijama imunog odgovora koje se okupljaju na mestu oštećenja, sintetišu i izlučuju faktore rasta, citokine i reaktivne vrste kiseonika i/ili azota. U slučaju da ne dođe do otklanjanja uzroka imunog odgovora, zapaljenski proces se nastavlja i nastaju tzv. dugotrajna (hronična) zapaljenja. Hronične zapaljenja su ključni činioci u patogenezi mnogih oboljenja poput ateroskleroze, kancera, Parkinsonove i Alchajmerove bolesti, astme itd. [40]. Protivzapaljensko dejstvo propolisa i njegovih komponenti tema je više naučnih studija, pa su tako Funakoši-Tago (Funakoshi-Tago) i saradnici proučavali efekte flavonoida izolovanih iz etanolnog ekstrakta nepalskog propolisa na signalni put interleukina-33 (IL-33). Izolovani polifenoli 3',4'-dihidroksi-4-metoksidalbergion, 4-metoksidalbergin, cearoin i hrizin, inhibiraju ekspresiju informacionih ribonukleinskih kiselina (iRNK) „inflamatornih” gena u matičnim ćelijama koštane srži za interleukin-6 (IL-6), α -nekrozni faktor tumora (TNF- α) i intereleukin-13 (IL-13), kontrolisanih IL-33. Oni utiču na aktivaciju nuklearnog faktora kapa B-ćelija (NF κ B) i posrednu inhibiciju ekspresije citokina. Takođe, inhibiraju aktivaciju inhibitora kinaze nuklearnog faktora kapa B-ćelija (IKK), što rezultuje degradacijom α -inhibitora pojačivača gena za nuklearni faktor B-ćelija lakog kapa lipoproteina (I κ B α), i na taj način onemogućavaju izlazak novih količina NF κ B iz jedra [41, 42].

Oslobađanje i oksidacija arahidonske kiseline je jedan od ključnih koraka u zapaljenskom procesu. Ang (Ang) i saradnici su analizom komponenti etanolnog ekstrakta propolisa pokazali da prenil ester kafeinske kiseline (CAPE), kafeinska kiselina, kvercetin i naringenin veoma efikasno inhibiraju biosintezu eikozanoida utišavanjem lipooksigenaznog puta arahidonske kiseline. Za CAPE je takođe pokazano da u velikoj meri inhibira biosintezu proinflamatornih citokina IL-1 β , TNF- α i hemoatraktantnog proteina monocita-1 (MCP-1) sa lipopolisahiridima stimuliranih makrofaga RAW264.7 [43].

2.3.3 Imunomodulatorna aktivnost

Efekti etanolnog ekstrakta brazilskog propolisa na imuni sistem praćeni su kod BALB/c soja laboratorijskih miševa i uočeno je da on utiče na početne korake imunog odgovora. Dolazi do povećane ekspresije tol (toll) sličnog receptora-2 (TLR-2) i TLR-4, kao i preinflamatornih citokina IL-1 i IL-6 u makrofagnim i ćelijama slezine [44]. U studiji rađenoj na ćelijama humanih monocita isti tip ekstrakta je povećao ekspresiju TLR-4 i klastera diferencijacije 80 (CD80), kao i produkciju TNF- α i IL-10, u zavisnosti od koncentracije. Povećana je fungicidna aktivnost tretiranih monocita, a TLR-4 i TLR-2 su pritom bili blokirani.

U studiji efekta zelenog brazilskog propolisa na humane ćelije makrofaga, povećana proizvodnja H₂O₂ i NO je uvećala antimikrobni potencijal i njihovu aktivnost. Imunomodulatorni efekat propolisa se dovodi u vezu i sa uvećanom limfocitnom proliferacijom. Smatra se da su za povećanu proliferaciju ćelija slezine odgovorni flavonoidi iz propolisa posredstvom uvećanog dejstva interferona γ (INF- γ), produkta ćelija slezine [45].

Jang (Yang) i saradnici su predložili da bi CAPE mogao da se koristi u terapiji astme i drugih alergijskih reakcija, s obzirom da preko NF κ B signalnog puta inhibira proizvodnju citokina i hemokina dendritskih ćelija nastalih od humanih limfocita (MoDCs) [46]. Druga grupa autora je ukazala da brazilski propolis značajno inhibira timusne T1 ćelije imunog sistema. Propolis time pospešuje produkciju CD4 T ćelija INF- γ zavisnog puta od pomoćnih T1 ćelija (Th1). Svoje zaključke su potkrepili i u

in vivo eksperimentima na miševima kod kojih je izazivano zapaljenje debelog creva (kolitis). Jedinke kojima su kroz hranu unosili i propolis bile su dosta otpornije na infekciju nego kontrolna grupa, hranjena na uobičajen način [47].

2.3.1 Antimikrobna aktivnost

2.3.1.1 Antivirusno dejstvo

Smatra se da je upravo kompleksnost i raznovrsnost jedinjenja koja se nalaze u propolisu ključan faktor za njegovo antivirusno dejstvo. I pored relativno malog broja naučnih studija koje su se bavile ovom tematikom, ne može se izbeći zaključak da, bez obzira na različitost područja sa kojih potiče, propolis ima veoma izraženo antivirusno dejstvo. Ono se ispoljava na različitim nivoima, a u nekim slučajevima i delovanjem na proces replikacije pojedinih virusa poput herpes simpleks virusa tip 1 i tip 2 (HSV-1 i HSV-2), adenovirusa tip 2, virusa gripa, humanog imunodeficijentnog virusa (HIV) itd. [48-50]. Šnicler (Schnitzler) i saradnici su ispitivali dejstvo ekstrakta češkog propolisa, kao i pojedinačnih komponenti (kafene, *p*-kumarinske i benzoeve kiseline, galangina, pinocembrina i hrizina) na HSV-1 u ćelijskoj kulturi. Svi testirani ekstrakti su pokazali izuzetnu anti-HSV-1 aktivnost, kao i hrizin i galangin za koje je utvrđeno da su nosioci antivirusne aktivnosti u propolisu. Propolisni ekstrakt deluje i na razvoj vaskularnog stomačnog virusa (VSV) [51]. Pokazano je da vodeno-metanolni ekstrakt geopropolisa, (proizvod *Scaptotrigona postica*) iz Brazila inhibira HSV replikaciju, kao i ulazak virusa u ćelije. Ove aktivnosti su pripisane katehin-3-*O*-galatu, 3,4-dikafeoilhinatu i *C*-glikozilovanim flavonima. Tait (Tait) sa saradnicima je ukazao da prirodni i sintetički flavonoidi verovatno utiču na replikativni mehanizam pikorna virusa sprečavajući otvaranje viralnih partikula i oslobađanje virusne RNK u ćeliju domaćina ili, pak, blokirajući sintezu viralne RNK. Ista grupa autora je pokazala da različiti homoizoflavonoidi imaju dobro antivirusno dejstvo protiv koksaki virusa B3, B4 i A9, kao i ekovirusa [52].

2.3.1.2 Antibakterijska aktivnost

Antibakterijska aktivnost propolisa je veoma dobro proučena. Ova tematika je postala posebno popularna u poslednjoj deceniji zbog pojave „superbakterija” otpornih na do sada poznate antibiotike, koja je posebno izražena u medicinskim ustanovama u kojima, zbog svakodnevne velike upotrebe antibiotika, dolazi do veštačke selekcije rezistentnih klonova. Sva dosadašnja istraživanja ukazuju na to da su *Gram*-pozitivne bakterije mnogo osetljivije na dejstvo propolisa u odnosu na *Gram*-negativne. Smatra se da svoje dejstvo propolis ispoljava smanjujući njihovu pokretljivost i enzimsku aktivnost delujući na nivou plazma membrane [53].

U eksperimentu tretmana *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Rhodobacter sphaeroides* etanolnim ekstraktom propolisa, cimetnom kiselinom i flavonoidima, Mirzoeva (Mirzoeva) i saradnici su predložili mehanizam njihovog delovanja. Komponente propolisa utiču na promene u jonskoj propustljivosti membrane, rasipanja membranskog potencijala i nemogućnosti kretanja bakterija [54].

Helicobacter pylori, ključni patogen čira na želucu poseduje peptidnu deformilazu, enzim koji uklanja formil grupe sa *N*-kraja novosintetisanog (nascentnog) polipeptidnog lanca. Rezultati rendgenske strukturne analize i apsorpcione spektroskopije ukazuju da se CAPE ponaša kao kompetativni inhibitor blokirajući ulaz u aktivno mesto peptidne deformilaze. S obzirom da je ovo prvi i ključni korak kod posttranslacione modifikacije novosintetisanih polipeptida neophodan za normalno funkcionisanje organizma, CAPE je odličan kandidat kao potencijani terapeutik u lečenju infekcija izazvanih bakterijom *Helicobacter pylori* [55].

Određeni broj studija se bavio potencijalnim sinergističkim delovanjem između propolisa i antibiotika. U svom radu Skazokio (Scazzocchio) sa saradnicima je pokazao da etanolni ekstrakt italijanskog propolisa drastično pojačava efekat ampicilina, gentamicina i streptomocina, delimično hloramfenikola, ceftriksona i vankomicina. U slučaju eritromicina nije bilo nikakvih promena. Istraživanje je rađeno na kliničkim izolatima *Gram*-pozitivnih bakterija. Sinergistički efekat nije primećen kod etanolnih ekstrakata bugarskih i brazilskih propolisa u kombinaciji sa citrofloksazinom, norfloksazinom (antibiotici koji deluju na nivou DNK) i kotrimoksazolom (deluje na metabolizam bakterija) [56, 57].

Određeni sojevi bakterija, poput *Streptococcus aureus*, rastu i u formi biofilma čime je njihova rezistentnost na antibiotike dodatno pojačana. Testirane su površine impregnirane nanohidroksiapatitom (nano-HA) u kombinaciji sa zelenim i crvenim brazilskim propolisom. Kada se nano-HA impregnira etanolnim ekstraktom crvenog propolisa (koncentracije 12 i 25 µg/mL) dolazi do smanjenja od 99% vijabilnih bakterija, dok je kod primene zelenog propolisa, ovo smanjenje 45 i 61%. Značajniji je podatak da pri tako visokim koncentracijama etanolni ekstrakt u oba slučaja inhibira formiranje biofilma streptokoka za 80% [58].

2.3.1.3 Antigljivična (antifungalna) aktivnost

Slično antivirusnoj i antibakterijskoj aktivnosti, i antigljivična aktivnost propolisa u direktnoj je zavisnosti od njegovog hemijskog sastava. Falko (Falcao) sa saradnicima je testirao antigljivičnu aktivnost portugalskog propolisa na sojevima *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* i *Aspergillus fumigatus*. Testirani uzorci su se pokazali kao izuzetno potentni protiv *T. rubrum*, nešto slabije protiv *C. albicans*, dok ne tako dobro u slučaju *A. fumigatus*. Zanimljivo je istaći da je ista grupa istraživača testirala i ekstrakte smola biljaka za koje se smatra da su izvor propolisa u Portugaliji, i da oni nisu ispoljili skoro nikakvu aktivnost [59]. Etanolni ekstrakti poljskog propolisa su pokazali odlične rezultate pri tretmanu *C. albicans*, *C. glabrata* i *C. krusei* [60]. Rezultati antigljivične aktivnosti *n*-heksanskog ekstrakta crvenog brazilskog propolisa prema gljivama roda *Candida* slični su sintetičkom fungicidu flukonazolu. Pretpostavljeni mehanizam delovanja brazilskog propolisa je baziran na indukovanju apoptoze posredovanom metakaspazama. Do ovih zaključaka se došlo nakon pojave rezistencije kod tretiranih *Candida* sojeva sa mutacijom gena za metakaspaze. Ista grupa autora je testirala potencijal kreme i gelova na bazi propolisa u kontroli vulvovaginalne *Candide* na miševima. Dobijeni rezultati ukazuju na veliki potencijal propolisa kao terapeutika u kontroli ovog patogena [61].

2.3.1.4 *Antitumorska aktivnost*

Maligna bolest ili tumor je abnormalna masa tkiva koja nastaje kao rezultat nekontrolisanog rasta ćelija. Maligna oboljenja nastaju neoplastičnom transformacijom ćelija i tkiva, pri čemu je neoplastična transformacija proces narušavanja tkivne homeostaze u pravcu nekontrolisane proliferacije ćelija i inhibicije ćelijskog umiranja tipa apoptoze. Neoplastična transformacija je višestepeni proces u kome ćelija gubi različite kontrolne mehanizme, što rezultuje u uvećanju potencijala rasta, izmenama na nivou ćelijske membrane, morfološkim i biohemijskim izmenama, rezultujući kariotipske abnormalnosti i promenu drugih ćelijskih osobina [62].

S obzirom da je propolis smeša kompleksnog hemijskog sastava, predmet je istraživanja na polju novih terapeutika u lečenju maligniteta. Upravo kompleksnost procesa neoplastične transformacije i velikog broja potencijalnih mesta za delovanje terapeutika, kao i veliki broj bioaktivnih fitohemijskih komponenti propolisa bili su dobar razlog za istraživanja i testiranje preparata na bazi propolisa kao potencijalnih terapeutika u lečenju malignih oboljenja. Rezultati *in vitro* studija pokazuju izuzetnu citotoksičnost propolisa različitog geografskog porekla i pojedinih njegovih komponenti prema različitim vrstama tumorskih ćelijskih linija. U *in vivo* studijama na pacovima potvrđeni su rezultati *in vitro* studija uz napomenu da nije zapažena pojava nikakvih neželjenih efekata, posebno ne onih koji su karakteristični za konvencionalni pristup lečenja citostaticima i zračenjem. Prilikom primene propolisa dolazi do blokiranja specifičnih signalnih puteva onkogenih, čime se usporava ćelijski rast i proliferacija, smanjuje populacija stem ćelija kancera, pospešuje apoptoza, usporava angiogeneza tumora i menja mikrookolina tumora [63].

Etanolni ekstrakt propolisa iz Poljske uspešno inhibira rast i redukuje veličinu ćelija humanog melanoma (Me45) i kolorektalnog kancera (HCT 116) [64]. U eksperimentima sa ćelijama humanog kancera prostate, etanolni ekstrakt brazilskih propolisa drastično utiče na proliferaciju regulišući ekspresiju ciklina D1, B1, ciklinzavisnu kinazu (CDK) kao i inhibitor ciklinzavisnih kinaza p21 [65]. Propolis inhibira potencijal tumorskih ćelija da formiraju kolonije i promoviše nekrotične promene u HCT-116 ćelijama. Propolis umanjuje udeo mitotičkih ćelija i povećava ekspresiju p53 i Ki-67 gena kod miševa nosioca HCT-116 ćelija tumora. Vodeni

ekstrakt iranskog propolisa inhibira proliferaciju HL-60 ćelija utišavajući regulaciju Bcl-2 i aktiviranjem Bax gena [66, 67].

U *in vitro* i *in vivo* eksperimentima Vu je sa saradnicima pokazao da CAPE inhibira rast ćelija tumorskih linija MCF-7 i MDA-MB-231 bez značajnih efekta na zdrave ćelije, suprimirajući ekspresiju transkripcionih i faktora rasta, uključujući i NF- κ B. Kod PC3 ćelijske linije kancera prostate, CAPE indukuje dozno zavisnu apoptozu, što se dovodi u vezu sa gubitkom ekspresije inhibitora apoptoze cIAO-1, cIAAP-2 i XIAP [68, 69].

S obzirom da su za ubrzani rast, razvoj i proliferaciju ćelija tumora neophodni kiseonik i hranljive materije, angiogeneza je još jedan od ključnih koraka u razvoju bolesti. Kako somatske tako i tumorske ćelije sintetišu proangiogenetske faktore poput vaskularnog endotelijalnog faktora rasta (VEGF). VEGF stimuliše formiranje i razvoj novih krvnih sudova u tkivima. Etanolni ekstrakt brazilskog propolisa značajno umanjuje broj novoformiranih krvnih sudova i suprimira proliferaciju humanih umbikalnih venskih endotelijalnih ćelija (HUVECs) [70]. Ovaj efekat se uglavnom postiže indukovanjem apoptoze u endotelijalnim ćelijama koje formiraju cevčice krvotoka, posredstvom inaktiviranja signala preživljavanja ERK1/2 [71]. Ekstrakti propolisa koji sadrže artemisin C i CAPE značajno smanjuju količinu novoformiranih krvnih sudova redukujući ekspresiju VEGF i metaloproteinaza (MMPs) na nivou više različitih tipova ćelija [72].

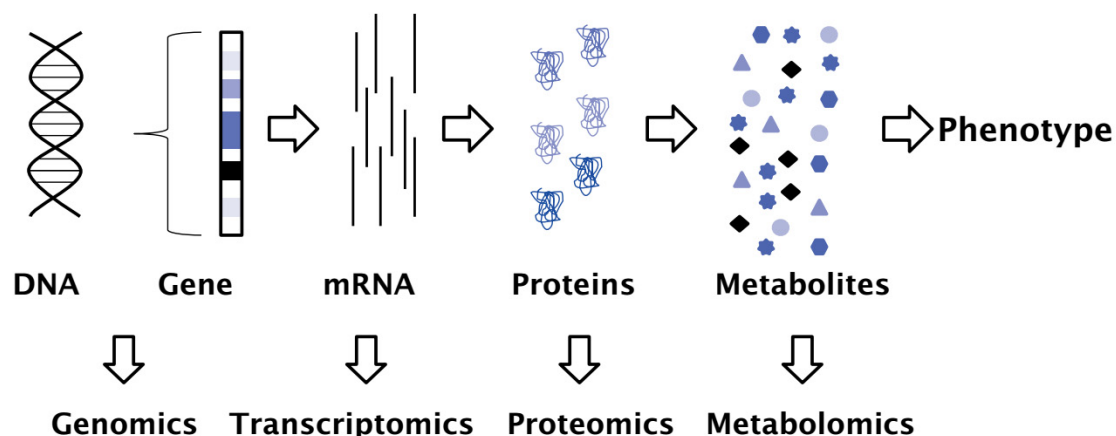
2.4 Primena statističkih metoda multivarijantne analize rezultata merenja u metabolomici

Pored uobičajene definicije da je metabolizam skup svih anaboličkih i kataboličkih procesa u ćeliji, možemo ga definisati i kao proizvod genoma i okruženja u kome se ćelija nalazi. Pri tome *Metabolom* predstavlja skup svih metabolita jednog organizma [73]. Imajući u vidu da se metabolomi jedinki iste vrste međusobno razlikuju, ova činjenica dovodi do zaključka da se on može iskoristiti kako bi smo napravili razlike među jedinkama. Jedan od primera je biljna vrsta koja raste u vlažnom i u sušnom klimatskom podneblju. Iako se radi o istoj biljnoj vrsti analizom

metaboloma listova sa različitih staništa uočice se razlike uslovljene spoljašnjim uticajima.

Metabolom se može analizirati na više načina: ciljano (targetna analiza), analizom metaboličkih profila i analizom metaboličkog otiska prsta. U ciljanoj analizi ispitivani analiti su unapred poznate komponente i ekstrakt uzorka se pri analizi dodatno prečišćava, kako bi se obogatio i samim tim povećao limit detekcije i kvantifikacije. Pri tome se podrazumeva da se za kvantifikaciju koriste referentni standardi. Kod analize metaboličkih profila se određuje nivo unapred određenih metabolita, poput ukupnih organskih kiselina, bez korišćenja standarda za kvantifikovanje svake komponente pojedinačno. Na taj način se dobijaju relativni odnosi (primer površine pikova u GC hromatogramu) radi poređenja različitih analita. Ovaj tip analize se često koristi u kliničkoj biohemiji, radi praćenja opšteg zdravstvenog stanja pacijenta analizom telesnih tečnosti pacijenata. Treći pristup, analiza metaboličkog otiska prsta, ne zasniva se na identifikaciji i kvantifikaciji pojedinačnih komponenti u uzorku, već se ukupan metabolički profil posmatra kao jedinstven (kao otisak prsta) u datoj ćeliji ili tkivu u datom trenutku. Za klasifikaciju metaboličkih profila po svojoj sličnosti koriste se programi za obrasce prepoznavanja [74].

Analiza profila svih ili bar većine značajnih metabolita ćelije se naziva *metabolomikom*. Često se još naziva i *metabonomikom*. Iako se ova dva termina često koriste kao sinonimi, postoje mišljenja da suštinski oni to i nisu. Tako se *metabolomikom*, u užem smislu te reči, smatra „sveobuhvatna analiza identifikacije i kvantifikacije metabolita biološkog sistema”. *Metabonomika* se definiše kao „kvantifikovanje velikog broja parametara metaboličkog odgovora biološkog sistema na patologiju ili genske modifikacije” [75]. Ako posmatramo metabolomiku na ovaj način, ona bi podrazumevala patološko remećenje ćelija i tkiva izazvanih fizičkim ili hemijskim stimulusima i praćenje promena u njihovom metabolizmu. Uprkos kritičkom stavu nekih stručnjaka iz ove oblasti velika većina naučne javnosti *metabolomikom* smatra proučavanje metaboloma.



Slika 4. Šematski prikaz omiksa (omics-a) i tipa molekula na koje se odnose [76]

Sama metabolomička studija pruža veliki broj podataka. Metabolički profil predstavlja čitav spektar ili hromatogram, koji čini ogromni broj podataka. Ovaj tip analize je gotovo nezamisliv bez upotrebe računara i programa za obrasce prepoznavanja. Programi za obrasce prepoznavanja koriste matematičke i statističke metode multivarijantne analize za grupisanje podataka i izvlačenje značajne informacije iz hrpe podataka. Analiza hemijskih podataka matematičkim i statističkim metodama je polje u nauci poznato kao *hemometrija* [77].

Postoji veliki broj statističkih i matematičkih modela koji se koriste u cilju proučavanja metabolizma i metabolomike uopšte. Najčešće korišćene metode su, pre svega, analiza glavnih komponenti (PCA), parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS), diskriminantna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS-DA), diskriminantna ortogonalna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (OPLS-DA) i diskriminantna dvosmerna ortogonalna parcijalna regresija najmanjih kvadrata (O2PLS-DA).

2.4.1 Priprema uzoraka za metabolomičku analizu

Najvažniji koraci kod metabolomičke analize su uzorkovanje i priprema uzoraka za analizu. Svaki od uzoraka potrebno je uzorkovati i pripremiti po istoj proceduri, kako bi se izbegle varijacije grešaka u ovim postupcima. Kod uzoraka biološkog porekla javljaju se dva problema: rast i razvoj mikroorganizama i delovanje enzimskih reakcija

nakon uzorkovanja. Njihovu inhibiciju je neophodno izvršiti što hitnije i to se najefikasnije postiže potapanjem u tečni azot i čuvanjem uzoraka na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Iako je ovo najefikasniji i najdelotvorniji metod vrlo često je na terenu to nemoguće sprovesti. Dobar alternativni pristup je uobičajeni postupak koji se koristi u molekularnoj biologiji. Uzorci se odmah po uzorkovanju pakuju u plastične kese sa anhidrovanim silika gelom i hermetički zatvaraju. Silika gel apsorbuje vlagu i isušuje uzorak. Vrlo je bitno u prvih par dana što češće menjati silika gel kako bi postupak bio što brži i efikasniji.

Način na koji će uzorci biti pripremljeni u najvećoj meri zavisi od instrumentalnih tehnika koje su na raspolaganju i kojima će se uzorci analizirati, kao i od vrste molekula koji se analiziraju. Ključni koraci u ovom postupku koji mogu uticati na rezultat analize su pravilno odmeravanje, homogenizacija i ekstrakcija uzoraka. Svaki od uzoraka je neophodno odmeriti što je tačnije moguće. Određivanje optimalne količine uzorka je takođe nešto na šta treba obratiti pažnju i utvrđuje se empirijski. Kod hromatografskih tehnika prevelike koncentracije mogu dovesti do širenja pikova usled preopterećenja hromatografske kolone i zasićenja detektora. Sve ovo dovodi do smanjivanja broja teorijskih podova kolone, pa samim tim i do gubitka rezolucije, efikasnosti razdvajanja i preklapanja pikova. Pored toga, gubi se linearnost odnosa količine analita u uzorku i površine (ili visine) pika. Kao poslednje, i ne manje važno, može doći do kroskontaminacije uzoraka. Da bi se to izbeglo i ujedno proverilo, najefikasnije je povremeno snimanje blank uzoraka [78].

Prevelika koncentracija analita može nepovoljno uticati i na proces šimovanja NMR instrumenta pri čemu se dobijaju prošireni pikovi. Prilikom pripreme uzoraka za snimanje NMR spektara treba izbegavati mogućnost kontaminacije uzoraka paramagnetikom, koja takođe može dovesti do širenja signala. Shodno tome neophodno je pre bilo kakvih izmena u postupku pripreme uzorka dobro preispitati sve korake.

Ništa manji problem nije ni sa niskim koncentracijama. Pri koncentracijama znatno manjim od optimalne najveći problem je gubitak osetljivosti i loš odnos signal šum. Preveliki šum u tom slučaju može dominirati, a pikovi analita niskih koncentracija mogu biti prekriveni ili izostati. Ovaj problem se kod NMR eksperimenata može prevazići povećanjem broja skanova što za posledicu ima povećanje trajanja analize. Najrobusnija tehnika po ovom pitanju je FT-IR ATR.

2.4.2 Obrada spektralnih podataka za multivarijantnu analizu

Pre multivarijantne analize spektralni podaci obično zahtevaju izvesnu obradu. I pored toga što je pripremna obrada podataka neophodna i važna za čitav proces, treba imati na umu da ona može dovesti i do pogrešnih tumačenja rezultata, ukoliko se neadekvatno primeni. Primarni cilj pripreme obrade podataka je da se ukloni šum i sačuvaju za analizu svi važni podaci. Moguće je sresti se sa dva tipa problema: da se otklanjanjem šuma uklone i važni podaci koji opisuju varijacije među uzorcima, ili, ako se ne ukloni dovoljno, da zamaskira ključne podatke koji su neophodni. Pri pripremnoj obradi se najčešće koriste sledeće operacije: smutovanje (*smoothing*), korekcija bazne linije, poravnavanje pikova (*peak alignment*), biniranje (*binning*), normalizacija i transformacije poput centriranja i skaliranja. Svi ovi postupci se u literaturi nazivaju „*signal preprocessing*” ili „*data preprocessing*”.

2.4.2.1 Smutovanje

Smutovanje je algoritamska operacija kojom se smanjuje nivo šuma i poboljšava odnos signal-šum u spektru ili hromatogramu. Najčešće se u te svrhe koristi Savitzky-Golay algoritam. Kao kod svih ostalih algoritama koji se koriste u te svrhe i u ovom slučaju je neophodno i ključno odrediti „širinu prozora” (*smoothing window*), kao i izabrati odgovarajući red polinoma. Sa povećanjem širine prozora dolazi do efikasnijeg otklanjanja šuma, ali i do gubitka dela signala i zaobljavanja pikova (Slika 6.). Izbor odgovarajućeg reda polinoma i širine prozora se određuje empirijski po principu pokušaja i greške.

2.4.2.2 Korekcija bazne linije

Pored nasumičnog šuma, spektri i hromatogrami neretko imaju i sistemsku baznu liniju koja ne potiče od samog uzorka već od drugih izvora. Najčešće je u pitanju „hemijski šum” koji zavisi od tipa matriksa. Ako je hemijski šum karakterističan za određenu klasu komponenti, bazna linija može postati vrlo važan faktor razdvajanja,

iako u tome prevashodnu ulogu treba da imaju signali koji potiču iz bioloških sistema. Druga mogućnost je da hemijski šum prekrije signale od interesa.

Najjednostavniji način uklanjanja signala bazne linije je u slučajevima kada je signal kontinuiran i linearan. Tada je moguće jednostavno obeležiti tačke u visini bazne linije i oduzeti je od ukupnog spektra ili hromatograma. Druga mogućnost je primena diferencijalnog računa. Ovo je klasičan matematički postupak i kao rezultat njegove primene može se dobiti potpuno izmenjen signal u odnosu na originalni. Posledica diferencijalnog otklanjanja šuma bazne linije je loš odnos signal-šum. Prema tome, pre korekcije bazne linije neophodno je izvršiti smutovanje, pri čemu treba voditi računa o širini prozora. Poželjno je i preporučljivo kod oba tipa korekcija koristiti aplikacije koje pruža softver na samom uređaju.

2.4.2.3 Poravnanje pikova (peak alignment)

Podaci koji se koriste u analizi obrazaca prepoznavanja su predstavljeni tabelarno u obliku matrica. U tabeli svaki od uzoraka je red, a njegove promenljive su prikazane u kolonama. Da bi modeli pravilno funkcionisali neophodno je da svaki od redova ima identičan broj kolona, kao i da svaka od kolona koje predstavljaju istu promenljivu u različitim redovima (uzorcima) bude jedna ispod druge. U suprotnom rezultat analize gubi smisao jer je posledica poređenja različitih promenljivih, koje sistem nije u mogućnosti da razlikuje.

Kako u NMR spektroskopiji, tako i u hromatografiji može doći do pomeranja pikova. U tačnoj hromatografiji promene retencionih vremena analita mogu biti značajne, i posledica su varijacija u temperaturi, pritisku, sastavu mobilne faze, promeni karakteristika stacionarne faze, ili usled efekta matriksa. Kod NMR spektroskopije glavni faktori koji utiču na promenu hemijskih pomeranja su izbor rastvarača i efekat matriksa uzorka. Najčešći problem kod uzoraka biološkog porekla su varijacije pH, tako da primena pufera nekada predstavlja najlakše i najbolje rešenje. U slučaju da nije moguće pripremom uzorka (podešavanjem pH) poravnati pikove neophodno je koristiti neko od niza softverskih rešenja, koja se zasnivaju na principu širenja i sabijanja bazne linije između pojedinačnih pikova. Suština je da se ručno obeleže pikovi koje treba

poravnati kao i početne i krajnje tačke. Nakon tih intervencija softver sabija ili širi prostore u hromatogramu ili spektru između označenih pikova.

2.4.2.4 Pakovanje (Bining)

Pakovanje podataka (engl. *binning* ili *bucketing*) predstavlja postupak smanjivanja broja podataka koji su deo modela. Uobičajeni postupak pakovanja podataka spektra ili hromatograma podrazumeva izjednačavanje fragmenata (paketića – *bins*). Pri tome je neophodno odrediti širinu fragmenta, tako da se kao vrednost intenziteta uzima srednja vrednost svih tačaka u paketiću ili najintenzivniji signal. Tipična širina fragmenta za NMR spektre je 0,04 ppm. Praktično to znači da se NMR spektar sa 65500 promenljivih svodi na svega 300 paketića.

2.4.2.5 Normalizacija

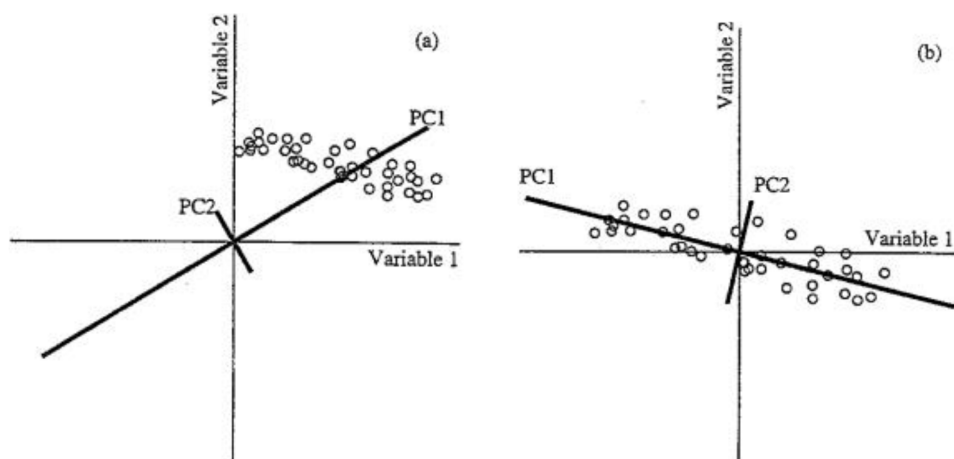
Normalizacija je postupak kojim različiti uzorci postaju međusobno poredivi. Postoji više razloga zbog kojih postoje razlike između uzoraka poput obogaćenosti uzorka analitom, nedovoljno preciznog odmeravanja ili greške prilikom razblaživanja.

Normalizacijom se svakom redu (uzorku) pridružuje određeni faktor normalizacije, npr. masa uzorka. Takođe, normalizacija se može vršiti i korišćenjem matematičkih postupaka, normalizacija integraljenjem (poznata i kao normalizacija površine ili normalizacija konstantnog zbira), vektorska normalizacija ili normalizacija maksimuma. Od svih pomenutih, normalizacija površine je najčešće korišćeni postupak u metabolomici, pogotovo ako se koriste spektroskopski podaci. Pri normalizaciji površina pretpostavlja se da je koncentracija uzorka proporcionalna ukupnom intenzitetu u spektru, koji predstavlja zbir intenziteta svih promenljivih. Princip je da se zbiru svih površina promenljivih pridruži ista jedinična vrednost svakom od uzoraka (ukupna površina je 1 ili 100%), a da se potom na osnovu pojedinačnih doprinosa svake od promenljivih ukupnoj površini odredi i pridruži njena vrednost. Neophodno je napomenuti da je nepravilno koristiti normalizaciju površina u slučajevima kada je kod uzoraka značajna razlika između samo nekoliko promenljivih.

Za razliku od normalizacije površina, u slučaju vektorske normalizacije najintenzivnijem pik u spektru se pridruži vrednost 100%, a svi ostali se porede u odnosu na njega. U komparativnoj analizi vektorska normalizacija se pokazala kao veoma loša usled prevelike osetljivosti pri promenama u samo jednom pik u.

2.4.2.6 Centriranje

Centriranje srednje vrednosti (eng. *mean centering*) je uobičajeni postupak. Prosečna vrednost se računa za svaku kolonu za sve vrednosti u toj koloni i srednja vrednost se oduzima od svake vrednosti u koloni. Rezultat je pojava negativnih vrednosti za one koje su manje i pozitivnih, za veće od srednje vrednosti. Posledica je da je srednja vrednost svih promenljivih jednaka nuli i najintenzivnije promenljive pokazuju velike devijacije u odnosu na nulu. Centriranje efikasno pomera fokus na fluktuirajući deo podataka. Centriranje srednje vrednosti je jedan od ključnih koraka kod PCA, i ako se izostavi, dolazi do lošeg uklapanja glavnih komponenti.



Slika 5. Podaci pre (levo) i posle (desno) centriranja srednje vrednosti. PC prave se efikasnije uklapaju nakon centriranja srednje vrednosti. Slika preuzeta iz knjige "Chemometrics a practical guide" Beebe i ostali.

2.4.2.7 Skaliranje

Kao što je slučaj sa mnogim drugim tehnikama i u hromatografiji i NMR spektroskopiji, intenziteti signala odgovaraju koncentraciji analiziranog jedinjenja. Komponente koje su prisutne u većim koncentracijama daju intenzivnije signale u spektru ili hromatogramu. Sa biološke tačke gledišta komponente prisutne u visokoj koncentraciji nisu nužno i najznačajnije za metabolom. Kao primer mogu poslužiti hormoni koji su regulatori metabolizma i nalaze se u niskim koncentracijama, a svaka i najmanja promena može dovesti do velikih promena u metabolomu i metabolizmu uopšte. S obzirom da se PCA fokusira na najveće varijacije među podacima, najintenzivniji pikovi imaju najveću varijansu, samim tim čitava pažnja je usmerena ka

njima, dok pikovi slabog intenziteta imaju relativno malu ulogu u modelu. Za razliku od nekih drugih sistema gde je sva pažnja usmerena upravo na glavne komponente i njihove varijacije, u metabolomici su presudne komponente u manjim koncentracijama i težište modela treba preneti na njih.

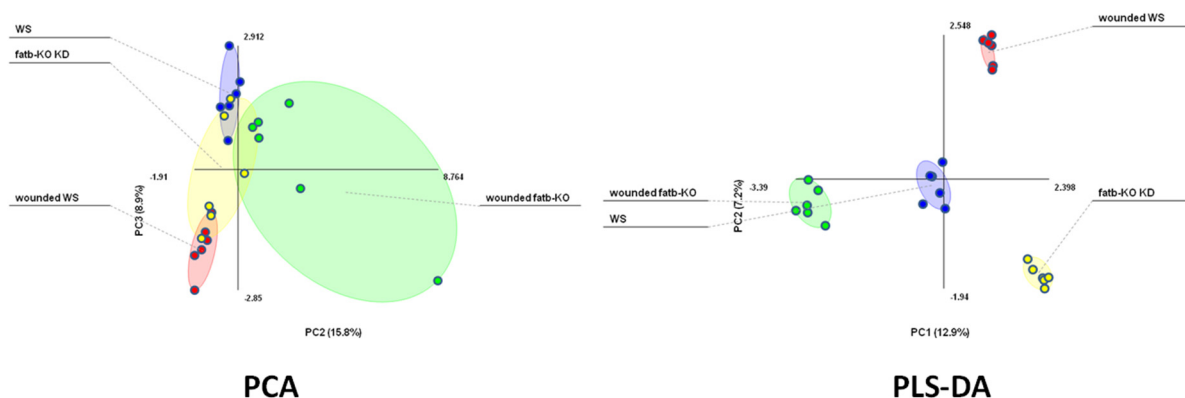
Skaliranjem se svim promenljivim u podacima daje podjednak značaj. Pri tome se svaka promenljiva (kolona) deli (ili množi) faktorom skaliranja koji je različit za svaku promenljivu. Postoji više metoda za skaliranje poput *autoscaling* ili *unit variance scaling*, *pareto*, *range*, *vast*, ili *level scaling*. Autoskaliranje je postupak u kome se centrirana srednja vrednost deli srednjom vrednošću standardne devijacije promenljive pri čemu je varijansa promenljivih 1. Jedini problem je što se povećanjem na značaju malih varijansi povećava i vrednost greške i efekat šuma je izraženiji. U praksi bi to značilo da je očigledno i jasno formiranje klastera ali da se doprinosi pojedinih komponenti ne mogu razaznati usled prevelikog šuma koji postaje značajan deo modela. Da bi se ovaj negativni sporedni efekat autoskaliranja umanjio neophodno je u prethodnim koracima obrade što je moguće više ukloniti šum.

Ako je kao rezultat autoskaliranja grafik doprinosa neupotrebljiv, *pareto* može biti dobra alternativa. Ovaj postupak je veoma sličan autoskaliranju, ali je faktor skaliranja kvadratni koren standardne devijacije. Rezultat je da promenljive niskog intenziteta imaju veću težinu, ali manju u odnosu na autoskaliranje, pa je samim tim šum manje izražen.

2.4.3 Parcijalna regresija najmanjih kvadrata i srodne metode koje se koriste u metabolomici

Za razliku od analize glavnih komponenti (PCA), parcijalna regresija najmanjih kvadrata (PLS) je statistička metoda bazirana na regresiji glavnih komponenti. Kod PLS analize se koriste dve tabele (X i Y), od kojih X predstavlja npr. spektralne ili hromatografske podatke za seriju uzoraka, dok Y predstavlja podatke sa kojima se traži korelacija (npr. rezultati bioloških testova), ili pripadnost klasi (kategorički jedinica ili nula, ili neke druge vrednosti) u slučaju PLS-DA. Ose se u PLS grafiku postavljaju na taj način da prolaze kroz područje najveće varijacije (sličnost u odnosu na PCA), i pri

tom da rezultati iz X budu u korelaciji sa rezultatima iz Y (razlika u odnosu na PCA). PLS-DA se vrši u cilju poboljšanja razdvajanja posmatranih grupa rotiranjem PC komponente tako da se dobije maksimalno razdvajanje među klasama, kao i definisanje koje od promenljivih su za to odgovorne. Stoga kod PLS-DA ne postoji druga mogućnost osim pripadnosti ili ne nekoj od klasa. Zapravo PLS komponente nastaju u pokušaju da se nađe kompromis između dve namene: opisivanja skupa promenljivih ili predviđanja njihovog odgovora. Ovim pristupom se postiže bolje razdvajanje u odnosu na PCA metodu.

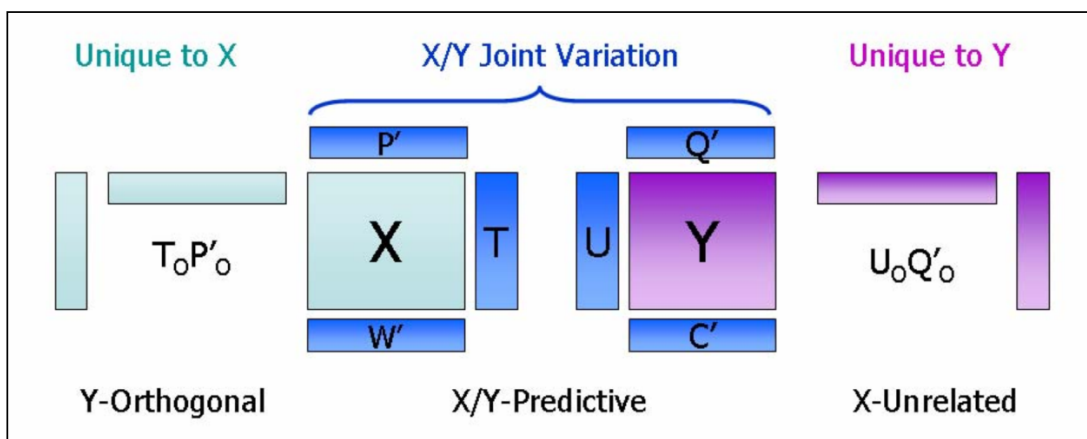


Slika 6. Primena PCA i PLS-DA modela u klasifikaciji. Slika kreirana u MultiBase EXCEL plugin, Data SetupX.

Koreni OPLS metode vode od razvoja različitih filtera u procesu multivarijantne kalibracije za uklanjanje neželjenih promenljivih u spektralnim podacima. Glavna zamisao ovog tipa analize je razdvajanje sistemskih varijacija u X tabeli na dva dela. Jedna grupa predstavlja varijacije koje su u direktnoj vezi sa Y, a drugu grupu predstavljaju varijacije koje su ortogonalne (normalne) u odnosu na Y tabelu. Ovakvom podelom podataka iz X tabele trebalo bi olakšati primenu i opisivanje (tumačenje) modela. Kod ovog tipa modela varijacije u X koje su korelisane sa Y nalaze se prikupljene duž prve (ili nekoliko prvih) predikcionih komponenti, dok su sve ostale varijacije u X koje ne zavise od Y predstavljene u preostalim, ortogonalnim komponentama [79].

Za razliku od PLS i OPLS kod kojih se iznalazi zavisnost samo promenljivih (varijabli) iz X tabele u odnosu na Y, odnosno klasifikacija određenih grupa na osnovu osobina opisanih u Y tabeli, kod O2PLS metode zavisnost je obostrana (bidirekciona).

Osim toga podaci u Y tabeli nisu nužno jednostavne informacije pripadnosti određenoj klasi kao kod PLS ili OPLS modela, već se mogu koristiti i spektralni ili hromatografski podaci. Primenom ovih modela opisuje se zavisnost tipa uzorka iz tabele X u odnosu na neku od osobina u tabeli Y, kao i zavisnost osobine iz tabele Y od tipa uzorka u tabeli X. Praktično ovo odgovara situaciji u kojoj postoje dva modela, jedan kreiran za X tabelu, a drugi za Y tabelu. Pri tome postoji međusobna predikciona zavisnost između modela kao i određeni stepen jedinstvenosti unutar pojedinačnih modela. Stoga se X može koristiti za predviđanje Y, a Y se može koristiti za predviđanje X. O2PLS model omogućava podelu sistemske varijacije na tri dela: za X i Y zajedničku (prediktivnu) varijaciju, Y ortogonalnu varijaciju u X i X ortogonalnu varijaciju u Y.



Slika 7. Šematski prikaz O2PLS modela

Na primeru NIR i Mid-IR analize mešavine pet različitih tipova alginata mogu se videti osnovni principi O2PLS metode. Ukupno 128 uzoraka je analizirano, pri čemu su rezultati NIR merenja uvršćeni u X tabelu, a Mid-IR u Y. Primenjen je 6+1+3 O2PLS model u kome šest komponenti opisuje zajedničku X/Y varijabilnost, jedna Y varijabilna komponenta u NIR spektrima koji su ortogonalna u odnosu na Mid-IR (nema je u Mid-IR) i tri X varijabilne komponente koje su jedinstvene za Mid-IR spektre. Kao što je očekivano, u ovom primeru postoji visok stepen preklapanja podataka u oba tipa spektara, minimalna jedinstvena varijabilnost je prisutna u NIR-u u odnosu na Mid-IR i nešto veća jedinstvena varijabilnost u Mid-IR spektrima u odnosu na NIR spektralne podatke [80].

Raspored uzoraka na grafiku skorova, u kome su strukturne komponente opisane sa prve dve predikcione komponente, u direktnoj je vezi sa odnosom različitih smeša u uzorcima i trouglastog je oblika. Ovakav tip raspodele je posledica preklapanja strukturnih informacija iz NIR i Mid-IR oblasti i sistematskih promena u sastavu uzoraka.

2.5 Analiza hemijskog sastava propolisa

Propolis se danas kao sirovina i/ili pomoćno lekovito sredstvo prizvodi i koristi u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Njegova široka primena zasniva se na višemilenijumskom iskustvu i na preko 12.000 referenci koje se mogu naći danas u SciFinder bazi podataka [81]. Paralelno su iznalažene i razvijane pogodne instrumentalne tehnike za njegovu hemijsku analizu i klasifikaciju. U te svrhe se pre svih koriste:

1. Hromatografske tehnike:
 - a. Tankoslojna hromatografija visokih performansi (HPTLC)
 - b. Visokoeffikasna tečna hromatografija (HPLC) i
 - c. Gasna hromatografija (GC)
2. Spektroskopske tehnike:
 - a. Ultraljubičasta spektroskopija (UV)
 - b. Infracrvena spektroskopija (IR)
 - c. Nuklearno magnetno rezonantna spektroskopija (NMR)

kao i kombinacije hromatografskih tehnika razdvajanja sa različitim tipovima detektora.

Osnovni zahtevi koje treba da ispuni određeni analitički postupak su: pouzdanost, osetljivost, ponovljivost, tačnost, dužina trajanja analize, kao i što niža ukupna cena. Sve do uvođenja statističkih metoda multivarijantne analize primena spektroskopskih tehnika bez predhodnog hromatografskog razdvajanja smatrane su nepogodnim.

2.5.1 Pregled izabranih referenci

U literaturi se sreće veliki broj radova čija tematika se bavi razvojem i primenom GC, GC-MS, LC, LC-MS i TLC tehnika u cilju profilisanja glavnih komponenti propolisa. Prilikom poređenja različitih uzoraka propolisa i formiranja profila, osim identifikacije pojedinačnih komponenti, neophodno je izvršiti njihovu kvantifikaciju. Konstruisanje kalibracione krive za svaku od pojedinačnih komponenti pri kvantifikaciji hromatografskim tehnikama je neizostavan ali i vremenski zahtevan proces.

Rezultati analize polifenolnog sastava 80% vodeno-etanolnih ekstrakata propolisa pomoću HPLC-DAD i HPLC-ESI-MS/MS instrumenatalnih tehnika predstavljeni su u radu Federike (Federica) i saradnika. U radu su dati detaljni eksperimentalni uslovi, UV maksimumi, kao i mase pseudomolekulskih i fragmentacionih jona za svaku od analiziranih komponenti. Pri tome su autori identifikovali 40 pojedinačnih komponenti. Dodatno su testirali performanse instrumenata sa jonskom zamkom u odnosu na trostruki kvadrupol kao analizator. Rezultati njihovog rada ukazuju da je za analizu flavonoida pogodnije koristiti instrumente sa trostrukim kvadrupolom kao analizatorom usled mogućnosti generisanja veće energije sudara (collision energy) što rezultira u većoj osetljivoti u odnosu na instrumente sa jonskom zamkom. Dodatno su izvršili validaciju metode određivanjem limita detekcije, limita kvantifikacije, korelacionih koeficijenta za standardne prave, rikaverija, ponovljivosti retencionh vremena i površina pikova tokom istog dana i u dva različita dana [82]. Metoda je pre svega razvijena za potrebe analize vodeno-alkoholnih ekstrakata propolisa na italijanskom tržištu. Rezultati su pokazali da, iako je kvalitativni sastav svakog od pojedinačno analiziranih uzoraka veoma sličan, postoji velika varijabilnost između koncentracija aktivnih komponenti. Metoda je predstavljena kao pogodna za analizu polifenolnih komponenti ekstrakta propolisa koji se koriste u fitoterapiji zbog svoje preciznosti i pouzdanosti ali je vremenski veoma zahtevna i skupa.

Istraživačka grupa Bankove i Popove u svojim radovima u kojima su određivale hemijske profile i/ili botaničko poreklo propolisa prikupljenih u Perm regiji Rusije [83], Grčke [20, 24], Malte [84] i Indonezije [85], kao metodu od izbora, koristila je gasnu hromatografiju sa masenim detektorom. Velika većina komponenti propolisa nije lako

isparljiva, te je ova istraživačka grupa prethodno derivatizovala uzorke koristeći *N,O*-bis(trimetilsilil) tfluoroacetamid (BSTFA) u cilju dobjanja trimetilsilil-derivata. Osim što gasna hromatografija kompleksnih smeša kao što je propolis sama po sebi dugo traje dodatni korak u pripremi uzorka je još više produžavao ukupno vreme potrebno za analizu.

Sliva (Sliva) i saradnici su u svom radu poredili rezultate reverzno-fazne visokoeфикаsne tankoslojne fromatografije (RFHPTLC), RFHPLC i GC/MS, izvršili hemijsku tipizaciju i odredili botaničko poreklo brazilskih propolisa [86].

Koristeći statističke metode klasteringa Sarbu (Sârbu) je analizom fotorafija TLC-a ploča dobijenih nakon razvijanja etanolnih ekstrakata propolisa prikupljenih u Rumuniji pokazala njihovu zavisnost od botaničkog i geografskog porekla [87].

Analizom uzoraka metanolno-vodenih ekstrakata propolisa prikupljenih mahom sa područja Republike Srbije, Ristivojević je u okviru svoje istraživačke grupe koristio HPTLC u kombinaciji sa metodama analize slika. Tako dobijeni rezultati su korišćeni u metodi multivarijantne analize za njihovu tipizaciju i klasifikaciju. Koristili su aluminiјumske ploče sa amino-silikatnom stacionarnom fazom za HPTLC u kombinaciji sa PCA analizom, klusterskom analizom (KA) i diskriminantne parcijalne regresije najmanjih kvadrata (PLS-DA) za analizu propolisa tipa topola. Primenom različitih filtera prilikom analize fotografija TLC ploča dobijenih nakon hromatografisanja ustanovljeno je postojanje dva različita profila nazvanih oranž i plavi [88,89]. U svom kasnijem radu ista istraživačka grupa je koristeći se TLC-MS tehnikom pokazala sličnost između oranž tipa propolisa sa fenolnim smolama crne topole (*Populus nigra*) i plavog tipa propolisa sa smolama aspena (*Populus tremuloides*) [90]. Oni su potom, koristeći se tehnikom autoradiografije, testirali dobijene TLC ploče na različite sojeve bakterija u cilju određivanja najpotentnijeg antimikrobnih agenasa poreklom iz propolisa tipa topola [91].

Savaja (Sawaya) je sa saradnicima primenio različite hromatografske tehnike razdvajanja komponenti brazilskog propolisa i njihovu kvantifikaciju. U sledećem koraku u svom radu primenili su i detaljno opisali masene spektre propolisa dobijene bez prethodnog hromatografisanja tehnikom tzv. direktne masene spektrometrije. Maseni spektri uzoraka propolisa su dobijeni primenom elektronsprej tehnike jonizacije u negativnom modu (ESI-) i grupisani u klustere na osnovu rezultata PCA metode

formirane od profila jonskih struja svakog od uzoraka. Ovaj eksperimentalni pristup je primenjen i na smole biljaka iz regija porekla uzoraka propolisa radi određivanja njihovog botaničkog porekla. Metoda direktne masene spektrometrije pokazala se kao pogodna i brza za profilisanje uzoraka propolisa i određivanja botaničkog porekla, međutim za detaljniju analizu pojedinačnih komponenti su neizbežne i hromatografske tehnike [92].

Visoka cena i dužina trajanja hromatografskih analiza kao njihove glavne mane, postavile su izazov pred analitičarima. Votson (Watson) sa saradnicima je u svom radu uporedio rezultate kvantitativne HPLC analize šest marker komponenti analiziranih u 43 uzorka 80% vodeno-etanolnih ekstrakata propolisa sa rezultatima ^1H NMR spektroskopije. Primenom PCA analize na rezultate ^1H NMR spektroskopije uzoraka propolisa iz Evrope, Afrike, Azije, Solomonskih ostrva i Brazila, dobijeni su klasteri uzoraka koji su se međusobno razlikovali po hemijskom sastavu. Utvrđeno je veoma dobro mapiranje prema geografskom poreklu kada se za konstruisanje PCA modela koriste prve tri glavne komponente (PC1, PC2 i PC3). Osim toga, analiziran je i antioksidativni kapacitet pojedinačnih uzoraka i rezultati su upoređeni sa rezultatima grupisanja na osnovu rezultata ^1H NMR-a. I u ovom slučaju primećana je korelisanost između dobijenih rezultata. Sve ovo je očekivano s obzirom da je već poznato da se propolisi iz pomenutih regija drastično razlikuju po hemijskom sastavu [93].

Vođena sličnim principom istraživačka grupa iz Italije je primenila ^1H i HMBC NMR eksperimente u kombinaciji sa faktorskom analizom (FA) i diskriminantnom analizom uopšte (GDA). U svom radu oni su analizirali etanolne ekstrakte ukupno 60 uzoraka propolisa prikupljenih na različite načine. Jednu grupu su činili uzorci skidani sa ramova, drugu prikupljeni mrežicama, a u trećoj grupi su bili uzorci prikupljeni sa proširenih ulaza u košnice. Udeo fenolnih smola u odnosu na udeo voska u svakom od uzoraka određen je gravimertijski i upoređen sa rezultatima dobijenim kombinacijom NMR spektrometrije, FA i GDA analiza. U oba slučaju došlo je do grupisanja uzoraka prikupljenih na isti način i formiranja klastera. Daljom analizom je utvrđeno da je najveći procenat fenolnih smola prisutan kod uzoraka prikupljenih korišćenjem mrežica. Rezultati krosvalidacije modela dobijenog opomoću ^1H NMR spektara, pokazao je predikcionu sposobnost od 96,7 %. Vrlo je bitno napomenuti da su tom prilikom korišćeni spektralni podaci u oblasti od δ 4,5 do 13 ppm [94].

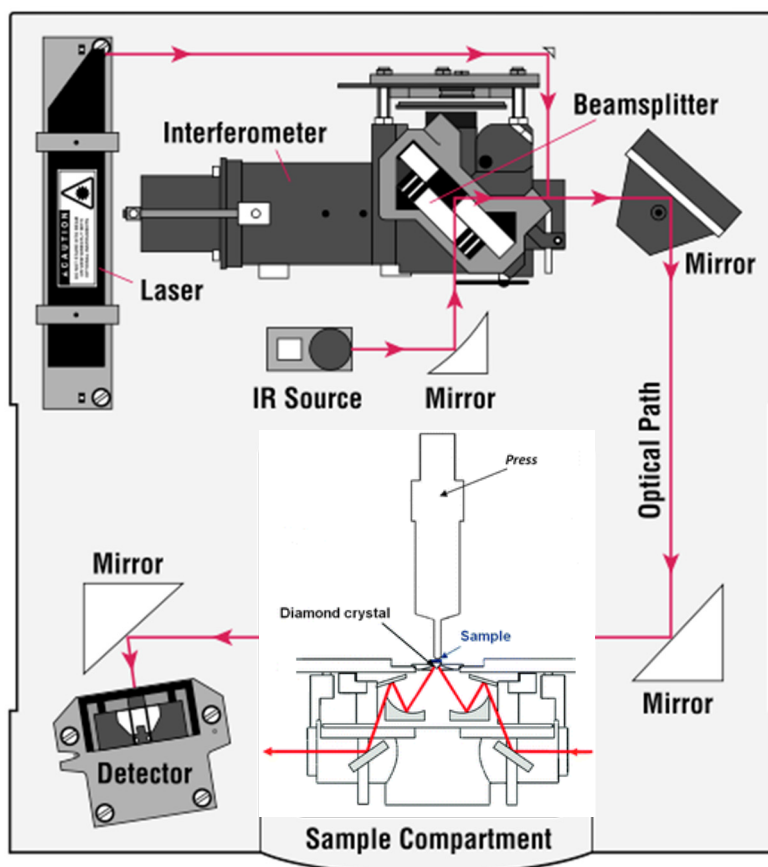
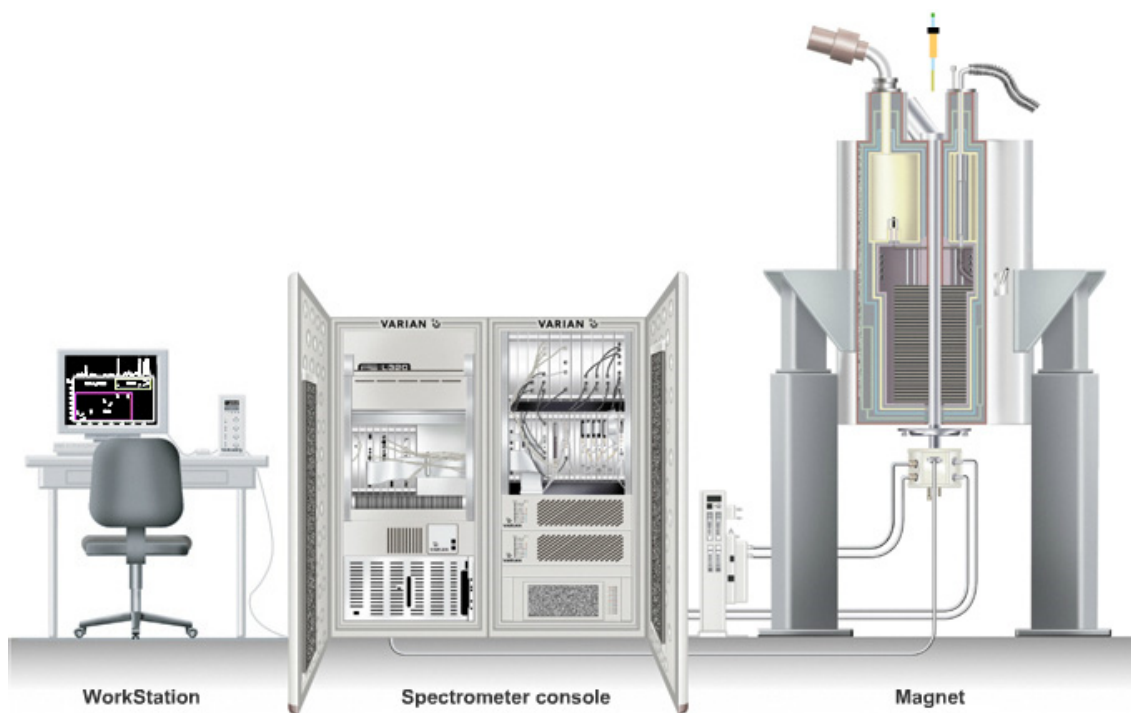
U svom radu Berteli (Bertelli) i saradnici su prikazali kako i sa kojom uspešnošću se može koristiti ^1H NMR spektroskopija za identifikaciju pojedinačnih komponenti za koje se smatra da imaju pozitivni efekat na zdravlje. Dvanaest tipičnih fenolnih komponenti propolisa je analizirano u svakom od 67 uzoraka. Za identifikovanje svake od njih korišćen je odgovarajući program, Analytical Profiler, dizajniran da prepozna pojedinačne komponente i potvrdi njihovo prisustvo u kompleksnim smešama. Za deset od dvanaest komponenti program ih je uspešno prepoznao i potvrdio njihovo prisustvo sa visokim stepenom verovatnoće u velikoj većini analiziranih uzoraka. Rezultati su dodatno potvrđeni poređenjem sa rezultatima HPLC/MS analize [95].

Pri klasifikaciji propolisa iz Indonezije, Juliana (Yuliana) i saradnici su koristili rezultate srednje oblasti FTIR spektroskopije u kombinaciji sa OPLS statističkom metodom. Tom prilikom su se fokusirali na uzorke sakupljene od podvrste pčela *Trigona* spp. Dve grupe uzoraka su dobijene kao rezultat njihovog rada, gde su u jednoj od njih svrstani uzorci iz područja West Nusa Tenggara, a svi ostali pripadaju drugoj grupi. Glavna razlika među uzorcima je u količini flavonoida i fenolnih kiselina, a samim tim i u oksidativnom potencijalu koji je takođe testiran [96].

Primenom statističkih metoda na rezultate dobijene bliskom infracrvenom spektroskopijom (NIR-IR) praćeno je geografsko poreklo i sadržaj flavonoida različitih regiona Kine. Rezultati su pokazali visok stepen poverenja prilikom određivanja geografskog porekla uzoraka [97].

Istraživačka grupa iz Brazila je koristeći rezultate ^1H NMR spektroskopije i metode multivarijantne analize u kombinaciji sa mašinskim učenjem (primenom algoritama pomoću kojih program formira najoptimalnije skupine sličnih uzoraka) pratila promene u hemijskom sastavu propolisa iz različitih regija Brazila prikupljenih tokom sva četiri godišnja doba. Rezultati njihovog rada ukazuju da je odabirom odgovarajućih statističkih metoda moguće pratiti promene u hemijskom sastavu propolisa u zavisnosti od sezonskih varijacija i regiona na teritoriji Brazila [98].

3 EKSPERIMENTALNI DEO



Šematski prikaz osnovnih komponenti FT NMR (gore) i FTIR-ATR (dole) instrumenata

3.1 Rastvarači i standardi

Metanol, metilen-hlorid i *n*-heksan, korišćeni pri ekstrakcijama su prečišćavani destilacijom pre upotrebe.

Standardi *p*-hidroksibenzoeve, ferulinske, izoferulinske, kafene i *p*-kumarinske kiseline kao i 1,3-di-*p*-kumariol-2-acetil glicerola, 1,3-diferuloil-2-acetil glicerola, 1-feruloil-2-acetil-3-*p*-kumariol glicerola, hrizina, naringenina, pinobanksina, 3-*O*-metilpinobanksina, 3-*O*-acetilpinobanksina, kvercetina, pinocembrina, benzilkafeata, izoramnetina, miricetina, luteolina, apigenina, kemferola, hesperetina i galangina su ranije izolovani u našoj laboratoriji. Koniferilbenzoat i *p*-kumarilbenzoat za potrebe ovog rada sintetisala je koleginica dr Aleksandra Mitrović u laboratoriji prof. dr Veselina Maslaka.

3.2 Prikupljanje uzoraka propolisa i pupoljaka topola

Ukupno je prikupljeno 64 uzorka propolisa, neposredno od pčelara u periodu od proleća 2008. do jeseni 2014. na teritoriji Republike Srbije (59), Bosne i Hercegovine (1) i Bugarske (1), Tabela 2. Uzorci su po prikupljanju čuvani u sterilnim bočicama na -18 °C.

Tabela 2. Oznake i nadmorska visina na kojoj je uzorkovano. U tabeli su dati i maseni procentni udeo fenolnih smola i voskova nakon ekstrakcije metanolom i *n*-heksanom kao i količina fenolnih smola za NMR analizu.

Šifra uzorka	Lokalitet	Nadmorska visina lokaliteta (m)	Maseni udeo		
			Fenolne smole (%)	Vosak (%)	Ostatak ekstrakcija (%)
BA1	Varvarin, RS	150	64	13	23
BA2	Irig I, RS	200	68,5	15	16,5
BA3	Kraljevo, RS	300	71	15	14
BA4	Rušanj I, RS	200	42,5	25,5	32
BA5	Luke I, Ivanjica, RS	550	72	10	18
BA6	Irig II, RS	200	51	21	28
BA7	V. Šiljegovac, Kruševac, RS	200	67	25	8
BA8	Vukanja, Kruševac, RS	500	69	18	13

Šifra uzorka	Lokalitet	Nadmorska visina lokaliteta (m)	Maseni udeo		
			Fenolne smole (%)	Vosak (%)	Ostatak ekstrakcija (%)
BA9	Kupinovo, RS	100	59	25	34
BA10	Čačak, RS	300	68	13	19
BA11	Luke II, Ivanjica, RS	550	59	16	25
BA12	Knjaževac, RS	150	59	18	23
BA13	V. Šiljegovac, Kruševac, RS	200	76	10	14
BA14	Zlatibor, RS	850	14	39	47
BA15	Rušanj II, RS	200	32	31	37
BA16	Deliblatska peščara I, RS	200	57	18	25
BA17	Vranje, RS	300	59	11	30
BA18	Novi Sad, RS	150	54	18	28
BA19	Rušanj III, RS	300	69	13	18
BA20	Luke III, Ivanjica, RS	550	72	14	10
BA22	Rušanj IV, RS	200	46	20	34
BA23	Grevci, Kruševac, RS	300	26	38	36
BA26	Homolje, RS	700	43	15	42
BA27	Blagojevac, BG	300	46	18	36
BA28	Petrovac na Mlavi, RS	300	34	13	53
BA29	Užice, RS	400	35	20	45
BA30	Kalna, RS	300	34	9	57
BA31	Rušanj V, RS	200	21	12	67
BA34	V. Šiljegovac, Kruševac, RS	200	42	15	43
BA35	Belegiš, Stara Pazova, RS	200	70	10	20
BA36	Stara Pazova, RS	200	21	20	59
BA37	Bosanski Brod, BIH	150	23	10	67
BA38	Kovin, RS	100	22	44,5	33,5
BA39	Banatski Karlovac I, RS	150	36	41,5	22,5
BA40	Banatski Karlovac II, RS	150	57	21	22
BA43	Banatski Karlovac III, RS	200	30	45	25
BA45	Deliblatska peščara II, RS	200	24	64	12
BA50	Arandelovac, RS	250	46	37	17
BA51	Prijepolje I, RS	400	35	42	23
BA52	Prijepolje II, RS	900	30	56	14
BA54	Deliblatska peščara III, RS	200	22	7	71
BA55	Deliblatska peščara IV, RS	200	60	28	12
BA56	Sopotnica, Prijepolje, RS	900	22	45	33
BA57	Međani, Prijepolje, RS	900	25	42	33
BA58	Miljevići I, Prijepolje, RS	700	15	38	47
BA59	Miljevići II, Prijepolje, RS	700	24	42	34
BA60	Babine, Prijepolje, RS	1000	21	51	28
BA61	Prijepolje III, RS	450	21	41,5	37,5

Šifra uzorka	Lokalitet	Nadmorska visina lokaliteta (m)	Maseni udeo		
			Fenolne smole (%)	Vosak (%)	Ostatak ekstrakcija (%)
BA62	Purića potok, Prijepolje, RS	400	14	38	48
BA63	Kosatica, Prijepolje, RS	800	19,5	61	19,5
BA64	Miloševo, Prijepolje, RS	600	22	36	42
BA65	Zalug, Prijepolje, RS	400	25	32	43
BA66	Zvijezda, Prijepolje, RS	900	13	44	43
BA67	Prijepolje II, RS	400	20	19	61
BA68	Prijepolje III, RS	450	18	43	39
BA69	Šušara, RS	200	50	12	32
BA70	Luke IV, Ivanjica, RS	550	30	35	35
BA74	Deliblatska peščara V, RS	200	21,5	10,5	68
BA75	Kikinda, RS	150	56	26	18

Uz pomoć kolega iz Instituta za nizijsko šumarstvo i topolarstvo iz Novog Sada, proleća 2014. godine, u njihovom rasadniku prikupljena je kolekcija od 50-ak uzoraka pupoljaka jasno definisanih vrsta topola koje se gaje i rastu na području Balkana. Pupoljci vrste *Populus tremula* su prikupljeni u okolini Valjeva, atar sela Gornja Bukovica.

3.3 Reakcije hidrolize i derivatizacije

Uzorci voska su hidrolizovani u baznoj sredini pri čemu su dobijeni alkoholi i kiseline koji su procesom esterifikacije prevedeni u trimetilsilil estre. Po 5 mg voska je dodato u 10 ml MeOH i 200 mg kalijum-hidroksida (KOH). Reakciona smeša je zagrevana do ključanja i refluktovana 3 h. Proizvodi hidrolize su ekstrahovani sa po 3 ml heksana i ekstrakt je sušen na anhidrovanom magnezijum-sulfatu (MgSO₄). Reakcija derivatizacije je rađena u umecima (insertima) od po 250 µl za bočice od 2 ml sa 100 µl osušenog *n*-heksanskog ekstrakta proizvoda hidrolize voska i 20 µl silanizacionog reagensa, *N,O*-bis(trimetilsilil) tifluoroacetamida sa dodatkom trimetil-silil-hlorida (BSTFA + TMCS, 99 : 1) firme SUPELCO, lot LC04480, je zagrevano 30 min na 60 °C.

3.4 Hromatografske tehnike povezane sa masenom spektrometrijom

3.4.1 LC/MS

Tečna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom urađena je na Agilent 1200 Series HPLC sistemu sa DAD detektorom u kombinaciji sa Agilent 6210 TOF-MS spektrometrom. Kao mobilna faza je korišćen sistem 0,2% mravlje kiseline u vodi (A) i acetonitrila (B) u gradijentnom programu: (0-3 min) 10% B, (3-8 min) 10-25% B, (8-11 min) 25% B, (11-18 min) 25-30% B, (18-48 min) 30-40% B, (48-68 min) 40-60% B, (68-88 min) 60-90% B, (88-100 min) 90% B, (100-101 min) 90-10% B, i (101-120 min) 10% B. Pri protoku od 1,2 ml/min i 10 μ l injektovane zapremine hromatografija je izvođena na Zorbax Eclipse Plus C18 (150 \times 4.6 mm; 1.8 μ m) koloni, termostatiranoj na 40°C. Za detekciju komponenti koje apsorbuju u opsegu talasnih dužina od 190 do 450 nm korišćen je DAD detektor.

Maseni spektri su dobijeni snimanjem negativno naelektrisanih jona (negativni mod) elektrosprej jonizacionom tehnikom (ESI) u opsegu masa od 50–2.500 m/z , pri naponu na kapilari od 400 V, temperaturi gasa za sušenje 350°C i protoku od 12 l/min, pritisku na raspršivaču od 45 psi (310,26 Pa) i naponu na fragmentoru od 70 V. Svi podaci su snimljeni i obrađivani pomoću MassHunter Workstation (verzija 1.0.0.1) i AnalystQS (verzija 1.98) programa.

3.4.2 GC/MS

Gasni hromatograf Agilent 7890A sa CTC-PAL autosemplerom i split/splitless multimod injektorom i tehnologijom kapilarnog protoka povezan na dva detektora je korišćen za GC-FID i GC-MS analize. Gasno-hromatografska kapilarna kolona je u ovom sistemu povezana na razdelnik kojim se količina analita koji silaze sa kolone deli na dva jednaka dela i putem kapilarnih cevi (bez stacionarne faze) prenosi do detektora. Ovakav odnos raspodele analita se postiže primenom kapilarnih cevi unutrašnjeg

prečnika 0,118 mm i dužine 144 cm (prema MS detektoru), odnosno 53 cm dužine (prema FID-u).

Za analizu su korišćeni sledeći uslovi: temperatura isparivača 250°C u splitless modu; kapilarna kolona HP-5MSI (dužine 30 m, prečnika 0,25 mm i 0,25 µm debljine filma stacionarne faze; *Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, SAD) pri konstantnom protoku helijuma kao nosećeg gasa od 1 ml/min na 210°C; početna temperatura kolone je 60°C sa kontinualnim porastom od 3 °C/min do 315°C. Kolona je poslednjih 15 min grejana na 315°C (Adams metoda). Temperatura FID-a detektora je iznosila 300°C.

Maseni spektri su snimani na *Agilent*-ovom kvadrupolnom analizatoru 5975C inert XL EI/CI Mass Selective Detector (MSD) tehnikom elektronske jonizacije (70 eV). Temperatura jonskog izvora je bila 230°C, a temperatura kvadrupola 150°C. Maseni spektri su snimani od 3,5 do 100 min pri analizi lakoisparljivih komponenti, odnosno od 11 do 100 min kod analize proizvoda hidrolize i silanizacije komponenti voskova u opsegu m/z vrednosti od 40 do 550. Za snimanje, analizu (dekonvoluciju i ekstrakciju pojedinačnih jona) i pretragu po bibliotekama spektara korišćen je MSD ChemStation data-analysis program, verzija E.02.02. povezan sa DRS (deconvolution reported software) i NIST AMDIS (automated mass spectral deconvolution and identification system) program verzija 2.70. Identifikacija pojedinačnih komponenti omogućena je pretragom po komercijalno dostupnim bibliotekama NIST 11 i Wiley 07, sa preko 500,000 dostupnih spektralnih podataka.

3.5 Spektroskopske tehnike

3.5.1 NMR spektroskopija

Približno 40 mg od svakog uzorka osušenog metanolnog ekstrakata fenolnih smola propolisa rastvoreno je u 500 µl DMSO- d_6 , neposredno pre snimanja. Za snimanje NMR spektara smola pupoljaka topole po 5 do 10 pupoljaka topola, zavisno od veličine, ekstrahovano je sa 500 µl DMSO- d_6 10-ak sekundi i procedeno neposredno pre snimanja.

Za identifikaciju pojedinačnih komponenti i asignaciju odgovarajućih pikova korišćeni su 1D spektri (^1H i ^{13}C) u kombinaciji sa 2D NMR spektroskopskim tehnikama (2D J , COSY, NOESY, HSQC i HMBC). Za dodatnu potvrdu pojedinih asigniranih struktura snimljeni su i spektri odgovarajućih standarda ili izolovanih supstanci. Hemijska pomeranja su izražena u δ jedinicama, a konstante sprežanja (J) u Hz.

Za NMR spektroskopska merenja korišćen je Brukerov spektrometar *AVANCE III* radne frekvencije 500,26 MHz (za ^1H jezgro) i probom širokog opsega (BBO -Broad band) sa gradijentom po Z osi i prečnikom kiveta od 5 mm. Kao rastvarač korišćen je DMSO- d_6 (Sigma Aldrich 99,8%). Za snimanje i obradu spektara korišćen je Brukerov kompjuterski program TopSpin verzije 3.2 i 3.5.

Za potrebe snimanja ^1H NMR spektara 32768 tačaka je prikupljeno koristeći standardni pulsni program „zg30” sa 128 skeniranja. Spektralna širina je podešena na 16 ppm (8012,82 Hz), vreme relaksacije 2 s (d1), vreme akvizicije 2 s, a položaj transmitera na 7 ppm. Kao referentni signal je korišćen signal rastvarača (DMSO) na 2,5 ppm. Ukupno vreme snimanja je oko 10 min.

Prilikom snimanja 2D J -razloženih spektara, spektralna širina je kao i kod ^1H NMR spektara bila 8012,82 Hz (F2) i 40 Hz po F1, vreme relaksacije 2 s i vreme akvizicije 0,51 po F2 i 0,8 s po F1. Spektri su snimani sa 16 skeniranja po svakom od 64 inkremenata po F1 sa FID-om od 8192 tačaka po F2. Položaja transmitera je 7 ppm u obe frekventne ose. Ukupno vreme trajanja analize je oko 55 min.

3.5.2 FTIR spektroskopija

Infracrveni spektri su snimani na instrumentu Nicolet 6700, Thermo Scientific metodom prigušene totalne refleksije (ATR) u oblasti od 1800 do 600 cm^{-1} . Pozadina je snimana pre svakog uzorka sa 32, a apsorpcija uzoraka je snimljena sa 64 skana i rezolucijom od 2 cm^{-1} . Na ATR-u je dijamant kao kristal sa upadnim uglom od 45° i indeksom refrakcije od 1,5. Korišćeno je polupropustljivo ogledalo sa proširenom KBr

oblašću (beam splitter-Extended KBr). Spektri su snimani i obrađivani u Omnic 7.0 programu.

3.5.3 UV-Vis spektroskopija

Za snimanje su korišćeni uzorci ekstrakata fenolnih smola propolisa i pupoljaka iz NMR kivetama razblaženi metanolom. Po 3 µl od svakog uzorka razblaženo je sa 3 ml MeOH u kvarcnim kivetama dužine optičkog puta 1cm. Kao slepa proba je korišćen rastvor 3 µl DMSO-a i metanola u istom odnosu kao i za uzorke.

Ultraljubičasti spektri snimani su na UV-VIS spektrofotometru Cintra 40. Spektri su snimani u oblasti od 250 do 500 nm brzinom od 2 nm/s. Za snimanje spektara korišćen je GBC Spectral 1.7 program, fajlovi su čuvani u DX formatu obrađivani u Omnic 7.0 programu.

3.6 Statističke metode analize fenolnih smola propolisa i pupoljaka topola

Za statističku obradu podataka korišćen je SIMCA softver (verzija 14, Umetrics, Umeå, Švedska). Spektralni podaci su normalizovani na ukupnu površinu, centrirani (mean centered) i skalirani (unit variance). Kod analize IR podataka dodatno je primenjen drugi izvod. Za ¹H NMR i 2D *J* iz analize su isključene oblasti od 3,14 do 3,22 i 3,86 do 4,47 ppm zbog prisustva signala metanola odnosno vode.

3.7 Biološki testovi

Etanol i propilenglikol su korišćeni za testiranje odgovarajućih ekstrakata propolisa na antibakterijsku aktivnost. Kao hranljiva podloga korišćen je TSB medijum (Tryptic Soy broth), a za kolorimetrijsku detekciju bakterija ljubičasta boja INT [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride; Sigma]. Streptomycin

(Streptomycin, Sigma P 7794) i ampicilin (Ampicillin, Panfarma, Beograd, Srbija) su korišćeni kao kontrole.

3.7.1 Antimikrobna aktivnost etanolnih i propilenglikolnih ekstrakata

Antimikrobna aktivnost je testirana metodom mikrorazblaženja (CLSI, 2009; Tsukatani *et al.*, 2012). Bakterijske kulture su gajene u tečnom medijumu u vidu suspenzija sterilnog slanog rastvora koncentracije od $1,0 \times 10^5$ CFU/ml (colony-forming units/ml). Količina od 500 mg 16 reprezentativnih uzoraka propolisa je ekstrahovana sa po 5 ml 70% etanola 72 h u mraku na sobnoj temperaturi. Postupak je ponovljen sa propilen-glikolom. Ekstrakti su razblaživani adekvatnim rastvaračem. Po 100 μ l od svakog razblaženja je testiran bakterijski rast (koncentracije $1,0 \times 10^4$ CFU po bunariću) u TSB medijumu (Tryptic Soy broth). Najniža koncentracija na kojoj nije pomećen rast bakterija na binokularnom mikroskopu je definisana kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Ovako dobijeni MIC-ovi dodatno su testirani kolorimetrijskom metodom, primenom selektivne *p*-jodonitrotetrazolijum ljubičaste boje (INT - 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride; Sigma) i poređenjem sa pozitivnom kontrolom svakog od bakterijskih sojeva.

Minimalne baktericidne koncentracije su određene dodatkom 2 μ l sub-kulture u 100 μ l hranljive podloge i inkubirane 24h. Koncentracija pri kojoj je izostao vidljivi rast bakterija definiše se kao minimalna baktericidna koncentracija (MBC). Pri ovoj koncentraciji dolazi do uginuća 99,5% prvobitno zasejanih bakterija u hranljivoj podlozi. Za dodatnu potvrdu uginuća bakterija merena je optička gustina svakog od bunarića uz pomoć Microplate manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories) na talasnoj dužini od 655 nm i poređena sa kontrolom i slepom probom. Streptomycin i Ampicilin su korišćeni kao pozitivne kontrole, a 5 procenata 70% etanola i propilenglikol na ukupnu zapreminu medijuma su korišćeni kao negativne kontrole.

3.7.2 *In vitro* antifungalna aktivnost ekstrakata propolisa

Po 100 µl rastvora ekstrakta svakog uzorka propolisa dodavano je u 25 ml PDA (Potato dextrose agar) podloge ohlađene na 40°C, u sterilne Petrijeve šolje (PŠ) prečnika 90 mm. Na centar PŠ sa potpuno ohlađenim agarom i dodatim ekstraktom propolisa stavljan je disk gljive *Fusarium oxysporum* prečnika 6 mm. Gljive su prethodno gajene tokom 10 dana na PDA agaru u termostatu na 25 ± 2°C. Na 10 PŠ sa PDA agarom postavljan je disk sa gljivom kao kontrola. Svaki od uzoraka rađen je u četiri ponavljanja i izračunata srednja vrednost. Sve PŠ su termostatirane na 25°C ± 2°C tokom 10 dana. Meren je prečnik porasle gljive kako u kontrolnim PŠ-a, tako i u PŠ-a sa testiranim ekstraktima propolisa. Procenat inhibicije rasta gljive računat je prema sledećoj formuli:

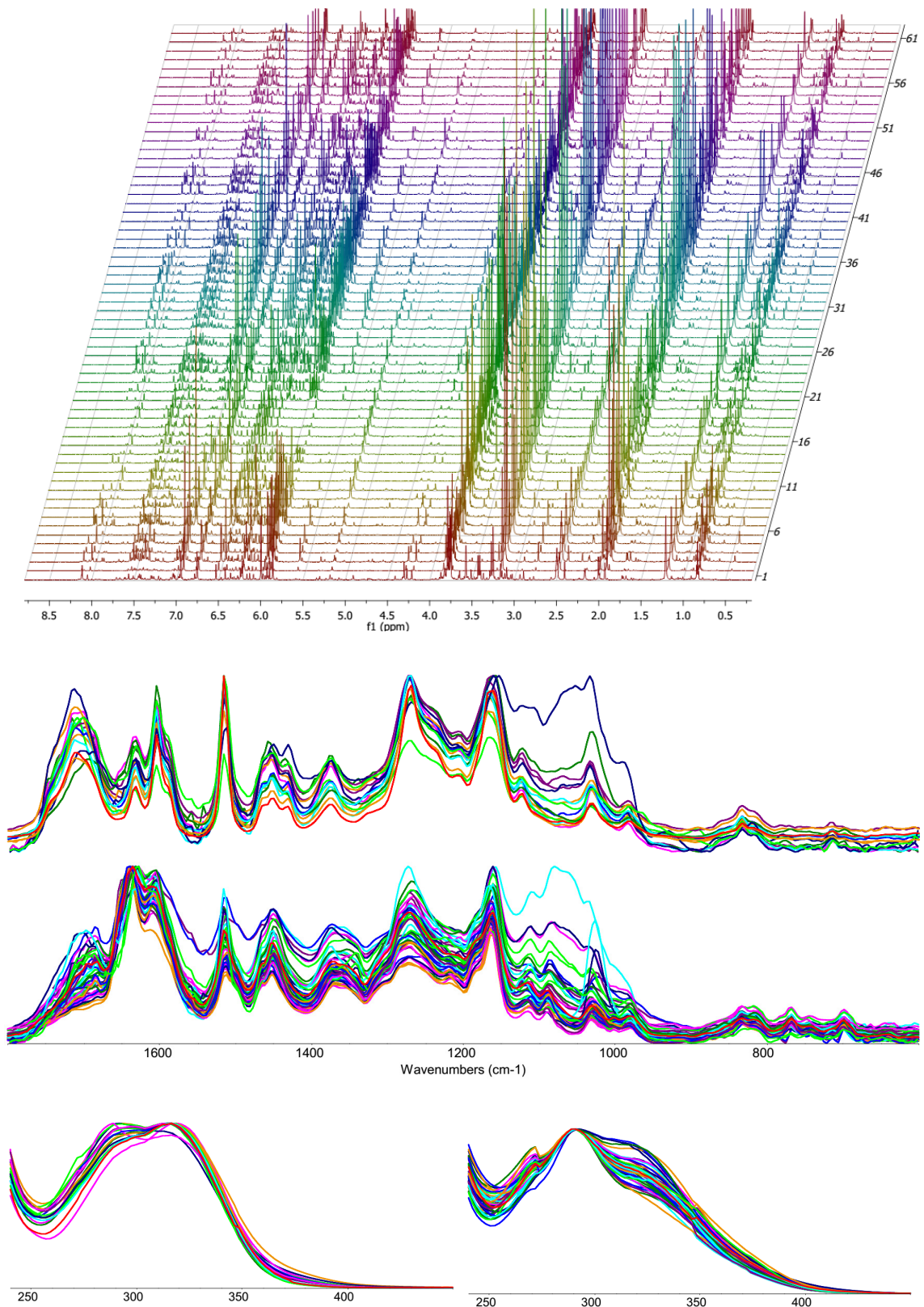
$$I (\%) = \frac{100 * (d_c - d_t)}{d_c * 100}$$

I – procenat inhibicije rasta gljive

d_c – rast gljive u kontrolnim PŠ (bez propolisa)

d_t – rast gljive u PŠ sa testiranim propolisima

4 NAŠI RADOVI



4.1 Analiza hemijskog sastava uzoraka propolisa i fenolnih smola pupoljaka

Fenolne smola ekstrahovane su iz uzoraka od po 0,5 g propolisa sa 5 ml metanola. Uzorci su čuvani u mraku 24 h na sobnoj temperaturi i 1 h u frizu na -18°C . Ekstrakti su potom proceđeni na filter papiru i isprani hladnim metanolom ($\approx 0^{\circ}\text{C}$). Uparavanjem na vakuum uparivaču, fenolne smole su oslobođene rastvarača i korišćene za dalje analize. Smole pupoljaka su ekstrahovane direktno iz 5 do 10 pupoljaka u 0,5 ml DMSO- d_6 i ti ekstrakti su direktno analizirani NMR, UV-Vis i LC/MS tehnikama.

4.1.1 LC/MS analiza fenolnih komponenti smola dva tipa propolisa

Fenolne smole 16 reprezentativnih uzoraka propolisa ekstrahovane po ranije opisanom postupku analizirane su HPLC/MS tehnikom. Uzorci fenolnih smola propolisa i pupoljaka su pripremljeni u metanolu u koncentraciji od ~ 10 mg/ml. Za karakterizaciju svakog od pikova su korišćeni UV maksimumi sa DAD detektora, izmerena m/z vrednost (tačna masa) i proračunata bruto formula. Poređenjem eksperimentalnih vrednosti sa podacima iz literature izvršena je tentativna identifikacija pikova (Tabela 3) [99–107]. Za 25 jedinjenja identifikacija je dodatno potvrđena na osnovu spektralnih podataka snimljenih standarda.

Tom prilikom je analizom HPLC/MS hromatograma okarakterisano 78 i tentativno identifikovano 76 različitih jedinjenja. Za 23 jedinjenja identifikacija je dodatno potvrđena poređenjem spektralnih podataka i retencionih vremena sa onim od odgovarajućih standarda.

Tabela 3. Rezultati HPLC/MS analize metanolnih ekstrakata propolisa i fenolnih smola pupoljaka topola.

RT (min)	UV _{max}	Bruto formula	Mr (izmereno)	Jedinjenje	Detektovano u			
					propolisu		topoli	
					ravničarski	planinski	<i>P. x euramericana</i>	<i>P. trmula</i>
4,4	234; 280	C ₇ H ₆ O ₃	138,0317	<i>p</i> -Hidroksi benzoeva kiselina	✓	✓		✓
5,8	240; 294r; 324	C ₉ H ₈ O ₄	180,0402	Kafena kiselina	✓	✓	✓	✓
6,0	294r; 324	C ₉ H ₈ O ₄	180,0420	Umbelinska kiselina	✓	✓		
6,8	234; 278	C ₇ H ₆ O ₂	122,0368	Benzoeva kiselina	✓	✓		
8,1	228; 288r; 310	C ₉ H ₈ O ₃	164,0460	<i>p</i> -Kumarinska kiselina	✓	✓	✓	
9,0	236; 290; 324	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,0581	Ferulinska kiselina	✓	✓	✓	✓
9,4	240; 298; 324	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,0580	Izoferulinska kiselina	✓	✓	✓	✓
9,5	288	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302,0802	Hesperetin	✓			
10,3	252; 312; 366	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316,0586	Kvercetin 3-O-metiletar	✓			
11,8	264; 326	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	492,1059	Kemferol 3-ramnozid	✓			

RT (min)	UV _{max}	Bruto formula	Mr (izmereno)	Jedinjenje	Detektovano u			
					propolisu		topoli	
					ravničarski	planinski	<i>P. x euramericana</i>	<i>P. trmula</i>
12,1	238; 292r; 322	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	208,0737	Dimetil etar kafene kiseline	✓	✓	✓	
12,7	260; 360	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300,0637	izo-Kemferid	✓	✓		
13,3	294r; 326	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	416,1097	Glicerol-1,3-diestar kafene kiseline				✓
13,4	232; 290; 335	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	288,0845	NI	✓			
14,0	256; 354	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,0482	Luteolin	✓	✓	✓	
14,1	256; 370	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,0432	Kvercetin	✓	✓	✓	
14,1	294r; 328	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	416,1097	Glicerol-1,2-diestar kafene kiseline				✓
14,3	268; 306	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	462,1167	NI	✓			
15,2	288	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	286,0838	Pinobanksin 3-metil-etar	✓	✓	✓	
15,8	256; 356	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316,0591	Ramnetin	✓	✓	✓	
16,5	294r; 314	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	400,1154	Glicerol-1,3-diestar kafene i <i>p</i> - kumarinske kiseline				✓
17,4	288	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272,0684	Naringenin halkon		✓	✓	
17,5	294r; 324	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	430,1260	Glicerol-1,3-diestar kafene i ferulinske kiseline				✓

RT (min)	UV _{max}	Bruto formula	Mr (izmereno)	Jedinjenje	Detektovano u			
					propolisu		topoli	
					ravničarski	planinski	<i>P. x euramericana</i>	<i>P. trmula</i>
17,8	294r; 326	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	430,1256	Glicerol-1,2-diestar kafene i ferulinske kiseline				✓
17,9	266; 336	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270,0528	Apigenin	✓	✓	✓	
18,3	292	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272,0683	Naringenin	✓	✓	✓	
18,7	264; 368	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,0483	Kemferol	✓	✓	✓	
19,2	252; 350	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300,0639	Luteolin-5-metil-etar	✓	✓	✓	
19,6	286	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	270,0895	Pinocembrin-5-metil-etar	✓	✓	✓	
19,9	254; 370	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316,0589	Ramnetin i	✓	✓	✓	
20,3	254; 368	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316,0587	izo-Ramnetin	✓	✓		
20,3	228; 292r; 312	C ₂₁ H ₂₀ O ₇	384,1207	Kalben A		✓		
20,6	290	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272,0689	Pinobanksin	✓		✓	
20,8	266; 350	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300,0642	Luteolin-metil-etar	✓	✓	✓	
21,5	230; 290r; 316	C ₂₂ H ₂₂ O ₈	414,1313	1,4-Butandiol diestar kafene kiseline		✓		
21,8	242; 294r; 326	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₀	458,1213	2-Aletilglicerol-1,3-diestar ferulinske kiseline		✓		✓

RT (min)	UV _{max}	Bruto formula	Mr (izmereno)	Jedinjenje	Detektovano u			
					propolisu		topoli	
					ravničarski	planinski	<i>P. x euramericana</i>	<i>P. trmula</i>
22,2	254; 356	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,0745	Kvercetin-dimetil-etar	✓		✓	
22,7	238; 294r; 324	C ₂₃ H ₂₄ O ₉	444,1415	Glicerol-1,3-diestar ferulinske kiseline		✓		
22,9	242; 294r; 326	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₀	458,1207	1-Aetilglicerol-2,3-diestar ferulinske kiseline				✓
24,0	260; 354	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284,0680	Galangin-metil-etar	✓	✓	✓	
24,50	288	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	328,0953	Pinobanksin-5-metiletar-3-O-acetat	✓		✓	
25,5	256; 368	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316,0592	nepetin	✓	✓	✓	
27,5	294r; 316	C ₂₃ H ₂₂ O ₉	442,1265	2-Acetilglicerol-1,3-diestar ferulinske i kumarinske kiseline		✓		✓
28,7	256; 356	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,0741	Kvercetin-dimetil-etar	✓	✓	✓	
29,0	294r; 314	C ₂₃ H ₂₂ O ₉	442,1265	1-Acetilglicerol-2,3-diestar ferulinske i kumarinske kiseline				✓
29,3	242; 296r; 328	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₀	472,1369	2-Acetilglicerol-1,3-diestar ferulinske i kafene kiseline		✓		✓
31,0	294r; 326	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	248,1056	Izoprenil estar kafene kiseline	✓	✓	✓	
	242; 296r; 326	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₀	472,1365	1-Acetilglicerol-2,3-diestar ferulinske i kafene kiseline				✓

RT (min)	UV _{max}	Bruto formula	Mr (izmereno)	Jedinjenje	Detektovano u			
					propolisu		topoli	
					ravničarski	planinski	<i>P. x euramericana</i>	<i>P. trmula</i>
31,4	265	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254,0578	Hrizin	✓	✓	✓	
32,5	356	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256,0736	Izolikuiritigenin	✓		✓	
32,6	294r; 326	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	248,1056	Izoprenil estar kafene kiseline	✓	✓	✓	
32,7	328	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	270,0890	Pinostrobin	✓	✓	✓	✓
33,0	292	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256,0737	Pinocembrin	✓	✓	✓	
34,3	360	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	270,0890	Galangin	✓	✓	✓	
35,0	292r; 312	C ₂₃ H ₂₂ O ₈	426,1313	2-Acetilglicerol-1,3-diestar cimetine i Kafene kiseline		✓		✓
35,4	290	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	286,0846	Sakuranetin	✓		✓	
36,6	294	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314,0757	Pinobanksin 3-O-acetat	✓	✓	✓	
37,1	294r; 316	C ₂₄ H ₂₄ O ₉	456,1418	2-Acetilglicerol-1,3-diestar <i>p</i> - kumarinske i ferulinske kiseline		✓		✓
37,4	296r; 328	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	284,1054	Prenil estar kafene kiseline	✓	✓	✓	
38,4	266	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	284,0625	Dimetoksihrizin	✓	✓	✓	
39,0	294r; 316	C ₂₄ H ₂₄ O ₉	456,1416	1-Acetilglicerol-2,3-diestar <i>p</i> - kumarinske i ferulinske kiseline		✓		✓
39,2	294r; 326	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₀	486,1527	2-Acetilglicerol-1,3-diestar ferulinske kiseline		✓		✓
39,4	268; 348	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	314,0795	Ermanin	✓			
41,3	294r; 326	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₀	486,1527	1-Acetilglicerol-2,3-diestar ferulinske kiseline		✓		✓

RT (min)	UV _{max}	Bruto formula	Mr (izmereno)	Jedinjenje	Detektovano u			
					propolisu		topoli	
					ravničarski	planinski	<i>P. x euramericana</i>	<i>P. trmula</i>
42,3	294r; 308	C ₁₄ H ₁₆ O ₃	232,1107	Metil-butenilestar kumarinske kiseline	✓	✓	✓	
43,5	294r; 312	C ₁₅ H ₁₂ O ₃	254,2861	Benzilestar <i>p</i> -kumarinske kiseline	✓	✓	✓	
43,8	294r; 312	C ₁₄ H ₁₆ O ₃	232,1102	Metil-butenilestar kumarinske kiseline	✓	✓	✓	
44,4	294r; 312	C ₁₄ H ₁₆ O ₃	232,1102		✓		✓	
45,7	248; 326	C ₁₈ H ₁₆ O ₄	296,1059	Cinamil estar kafene kiseline	✓	✓	✓	
46,1	292r; 326	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	284,1045	Koniferil estar benzoeve kiseline		✓		
46,9	/	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	312,2310	Dihidroksi masna kiselina	✓	✓	✓	
48,3	294	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	328,0952	Pinobanksin 3- <i>O</i> -propionat	✓	✓	✓	
49,0	312	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268,1063	Metoksi hrizin	✓		✓	
50,7	342	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	270,0896	Benzilestar kafene kiseline	✓			
55,9	262; 312	C ₁₈ H ₁₆ O ₃	280,1108	Cinamil estar - <i>p</i> -kumarinske kiseline	✓	✓	✓	
57,7	290; 324	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	342,1107	Pinobanksin 3- <i>O</i> -(butirat ili izobutirat)	✓	✓	✓	
63,7	292	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	356,1264	Pinobanksin 3- <i>O</i> -pentanoat	✓	✓	✓	
68,2	280	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	294,2203	Cinamil estar <i>p</i> -metoksicimetne kiseline	✓	✓	✓	
69,4	276	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	294,2196		✓	✓	✓	

RT – retenciono vreme, NI – Nije identifikovano, r – rame, Mr – molekulska masa

4.1.2 Ekstrakcija i GC/MS analiza isparljivih organskih jedinjenja i organskih komponenti pčelinjeg voska iz propolisa

Za analizu lako isparljivih komponenti propolisa uzorci su pripremljeni metodom simultane destilacije i ekstrakcije po Likens-Nikersonu. U balon od 500 ml je dodato ~2 g propolisa, 0,5 g NaCl, 250 ml destilovane vode i zagrevano do ključanja. U manjem balonu (50 ml) je dodato 5 ml metilenhlorida i zagrevano na vodenom kupatilu do ključanja. Posle 2 sata simultanog ključanja u oba balona, postupak ekstrakcije je prekinut, a metilenhloridni ekstrakt dalje analiziran GC-FID/MS tehnikom. Pojedinačne komponente su identifikovane poređenjem njihovih retencionih indeksa i masenih spektara sa spektrima iz bibloteka. Ukupno 14 uzoraka je analizirano. Detektovano je 150 jedinjenja od čega je 134 identifikovano poređenjem sa bazama podataka retencionih indeksa i masenih spektara. Za preostalih 16 su određeni retencioni indeksi, a u jednom slučaju i molekulska masa (Tabela 4).

Tabela 4. Relativni procentni udeli isparljivih jedinjenja odabranih uzoraka propolisa dobijeni GC-FID/MS analizom.

Retenciono vreme (min)	Ime jedinjenja	RI	Relativni procentni udeo isparljivih jedinjenja propolisa													
			BA 1	BA 5	BA 6	BA 13	BA 17	BA 28	BA 31	BA 34	BA 35	BA 38	BA 40	BA 43	BA 45	BA 51
4,03	2-Metilbutanska kiselina	849	0,7			Trag		0,4	0,2	Trag	0,2	0,1		1,2	Trag	0,3
4,81	Stiren	898	0,4	0,4	0,9	0,3	0,1	0,3	Trag	0,2	Trag	0,2	0,3	0,1	0,4	
4,89	<i>n</i> -Nonan	899	0,5	0,5	0,1	Trag	0,1	0,2	Trag	0,1	Trag	0,2	0,2	0,1	0,4	
5,54	Tiglična kiselina	922						0,3		Trag	0,2					0,1
5,95	α -Pinen	935	1,3	0,5	1,0	1,0	0,1	2,7								0,4
6,23	Izokapronska kiselina	946	Trag				Trag	0,6								
6,29	Kamfen	947	Trag				Trag	0,2	Trag							
6,54	Benzaldehid	960	0,7	1,2	0,8	0,4	0,9	0,6	Trag	0,6	Trag	0,3	0,4	0,1	1,3	
7,18	Kapronska kiselina	976	0,3				1,0									
7,36	2,2,4,6,6-Pentametilheptan	990		17,3		5,3		2,1	Trag	0,2			0,6	1,2	3,1	
7,83	Oktanal	1004	1,8	0,7	1,0		0,3	1,3		1,3	0,1	1,2	2,2	0,1	0,6	
8,78	1,8-Cineol	1031		1,6		0,4				0,3			Trag	0,1	0,2	
8,89	Benzil alkohol	1034	3,1		0,1	1,5	2,0	0,3		0,2	0,1	0,2	Trag	0,2	0,1	
9,22	Benzenacetaldehid	1045	0,2		Trag		0,1			Trag						
10,09	Acetofenon	1067	0,3		0,2		0,4	0,6	Trag	0,6	0,2	0,3	0,2			
10,33	<i>cis</i> -Linalol oksid	1074	0,4		0,2	0,1	0,3	0,2		0,1	Trag	0,2	0,3	0,1	0,3	
10,93	<i>trans</i> -Linalol oksid	1090	0,3	0,3	0,1		0,2	0,1		Trag	Trag	0,1	0,1	0,1	0,2	
11,36	Linalol	1102	0,4	0,8	0,7	1,0	0,7	0,8	Trag	0,5	0,2	1,1	1,0	0,6	5,0	
11,54	<i>n</i> -Nonanal	1106	3,3	1,5	1,6	0,2	0,6	3,1	Trag	2,0	0,3	3,0	4,6	0,5	1,5	
11,94	Fenetil alkohol	1116	3,5	0,3	0,1		1,9	0,8	Trag	0,7		0,1	0,1		0,3	
13,23	Kamfor	1145	Trag		Trag	0,3	0,1	Trag		0,1				0,2		
13,47	NI	1151	5,1	0,9	0,4	0,5	2,5	2,3		1,3	0,5	4,9	1,3	0,1	Trag	
13,50	1-Fenilbutadien	1151	2,5		1,6		0,6	1,1		0,8	0,2	1,6	1,2	0,5	9,1	
13,85	2-(<i>E</i>)-Nonenal	1159	0,1				Trag									
14,05	Benzil acetat	1164	0,3		0,1	0,4	0,2			0,1						

Retenciono vreme (min)	Ime jedinjenja	RI	Relativni procentni udeo isparljivih jedinjenja propolisa														
			BA 1	BA 5	BA 6	BA 13	BA 17	BA 28	BA 31	BA 34	BA 35	BA 38	BA 40	BA 43	BA 45	BA 51	
14,62	Terpinen-4-ol	1177	1,2						1,0			0,3			0,1		
14,88	Benzoeva kiselina	1181	1,2			Trag		1,0									
15,07	Oktanska kiselina	1186	0,4			Trag		0,4	0,1								
15,19	α -Terpineol	1190							0,1			Trag	Trag	Trag	Trag		
15,35	Metilsalicilat	1194						0,3			0,1						
15,92	<i>n</i> -Dekan	1206	8,3	0,9	2,6	2,3	0,2	1,3	4,3	Trag	5,0	0,7	4,6	9,5	0,9	0,9	
16,03	Verbenon	1210							Trag							0,1	
16,53	β -Ciklocitral	1222	0,2		0,3	0,2	0,5	0,1	Trag	0,2	0,1	Trag	Trag	Trag	0,3	1,8	
17,52	Benzilaceton	1241	0,3			0,1		0,2					Trag			Trag	
17,54	3-Fenil-2-butanon	1242							0,1		0,1			Trag		0,1	
18,11	2-Feniletil acetat	1257	0,3		0,2	Trag		0,3			0,2						
18,32	2-(<i>E</i>)-Decenal	1262	0,2					Trag	Trag								
18,73	(<i>E</i>)-Cinamaldehyd	1271	2,8			Trag		1,6	0,3	Trag	0,3	0,1	0,3	0,1		0,4	
19,21	Nonanska kiselina	1279	0,8			Trag		0,1	0,2				0,3				
19,35	Kogejeren	1285					0,3				Trag	0,2	Trag				
20,34	(<i>E</i>)-Cinamil alkohol	1308	3,1			Trag		1,2	0,1		Trag	0,1	0,1	0,1			
20,64	<i>p</i> -Vinil-gvajakol	1316	0,9			0,2		2,5	0,9	Trag	0,4	0,2	0,5	0,2			
21,17	Metil kaprat	1326			0,1				0,1								
22,24	α -Kubeben	1350		0,3				0,7								0,2	
22,55	4-Fenil-3-(<i>E</i>)-buten-2-on	1358	0,1			Trag		1,1	0,1								
23,02	Eugenol	1368	0,2			0,6		0,2	0,6	0,1			0,5	0,3	0,2		
23,21	α -Ilangen	1373		0,1			0,8	0,1	0,1	0,2						0,2	
23,40	α -Kopaen	1377	0,1	1,6	0,4	0,2	7,2	0,2	0,1	0,8	0,1	0,1			0,2	2,0	
23,53	1,2-Dihidro-1,3-dimetilnaftalen	1379														0,2	
23,59	Dekanska kiselina	1379	0,6					0,3						0,9			
23,80	β -Burbonen	1387		0,4			2,5									0,1	
24,83	Dodekanal	1409	1,0	0,1		0,1		0,1	0,3	Trag	0,3		0,4	0,8			

Retenciono vreme (min)	Ime jedinjenja	RI	Relativni procentni udeo isparljivih jedinjenja propolisa														
			BA 1	BA 5	BA 6	BA 13	BA 17	BA 28	BA 31	BA 34	BA 35	BA 38	BA 40	BA 43	BA 45	BA 51	
24,99	α -Kedrene	1413				0,1	Trag	Trag			Trag	0,1			Trag		
25,12	<i>cis</i> - α -Bergamoten	1415					0,1				0,2	0,1					
25,30	(<i>E</i>)-Kariofilen	1421	Trag	1,2		0,3	3,5	0,4	0,1	0,2	1,9	Trag	Trag	0,2	0,3	2,6	
25,71	β -Kopaen	1430		0,1			0,5										
25,93	<i>trans</i> - α -Bergamoten	1439	0,1		0,2	0,5	0,5	0,1	Trag		0,4	0,4		0,1	0,3	0,1	
26,08	α -Gvajen	1439		0,4													
26,32	6,9-Gvajadiene	1445		0,5			2,8	0,1									
26,36	(<i>E</i>)-Cinamil acetat	1446	0,4	Trag		Trag		0,3									
26,74	α -Humulen	1456		0,5	Trag	0,3	3,1	0,3	0,2		2,7		0,1	0,4	0,2	3,0	
26,91	(<i>Z</i>)- β -Farnezen	1460				0,3					0,1	0,4			0,1		
27,10	Allo-aromadendren	1464	0,1		0,7	0,2	3,8	0,3		1,6	Trag	0,2		Trag	0,3	2,4	
27,33	α -Akoradien	1469			Trag	0,1		Trag			0,2	0,2					
27,62	<i>trans</i> -Kadinal-4,6-dien	1476		Trag			0,4			0,1						0,5	
27,74	γ -Murolen	1479	0,1	0,7	0,7	0,2	2,5	0,4		1,4	Trag	0,2	Trag	0,1	0,4	1,8	
27,87	γ -Kurkumen	1482				0,3				0,1	0,8	0,5		0,1	0,2		
27,89	NI	1483					0,5	0,1								0,3	
28,01	Kurkumen	1486		0,1	1,2	0,5	0,3	0,4	0,1		1,0	0,8	Trag	0,1	0,4	0,3	
28,14	β -Selinen	1489		0,2			0,7	0,1	0,1		0,5			Trag	0,3	0,5	
28,17	Feniletil 3-metilbutanoat	1490	Trag			0,1		0,3		0,8	Trag		Trag				
28,35	10,11-Epoksikalamenen	1492	0,3	0,2	0,5	0,2	0,6	0,4	0,2	0,6	Trag	Trag	0,2	0,3	0,8	1,5	
28,49	Valencen	1495								1,1							
28,54	Indipon	1498			0,5								0,2	0,1	0,6		
28,55	NI	1498														0,7	
28,56	α -Selinen	1499	0,1				1,1	0,4	0,1	Trag	0,5						
28,72	Agarofuran izomer	1502	0,5			0,3	0,6		0,1			0,2	0,3	0,3		0,9	
28,79	α -Murolen	1504		0,5	1,6	0,4	1,3	1,5	0,2	2,8	0,3	0,4		0,3	0,5	2,9	
28,89	NI	1506	0,6		0,9	0,3	0,4	0,6	0,5	0,7	0,1	0,1	0,5	0,6	0,6	1,8	
29,14	β -Bisabolen	1521	Trag			0,1	Trag				0,2	0,3			Trag		

Retenciono vreme (min)	Ime jedinjenja	RI	Relativni procentni udeo isparljivih jedinjenja propolisa													
			BA 1	BA 5	BA 6	BA 13	BA 17	BA 28	BA 31	BA 34	BA 35	BA 38	BA 40	BA 43	BA 45	BA 51
29,23	β -Kurkumen	1515				0,2					0,3	0,8			Trag	
29,31	Seskvicineol	1517							0,1		1,4					
29,33	γ -Kadinen	1517	0,3	1,3	2,5	0,9	3,1	1,0	0,1	4,8		1,8	0,2	0,4	1,0	5,1
29,70	<i>trans</i> -Kalamenen	1526	0,5	Trag	0,1	1,1	3,9	1,8	0,1		Trag					2,0
29,71	δ -Kadinen	1526		2,6	3,5	3,2	3,8		0,1	8,2	0,9	2,4	0,3	0,7	1,9	8,6
30,07	<i>trans</i> -1,4-Kadinedien	1535						0,1	0,1		0,1	0,1				0,2
30,08	Italicen etar	1535									0,4					
30,27	α -Kopaenol	1541	0,7	0,5	2,3	1,1	1,4	1,8	0,8	5,1	0,2	0,2	0,9	2,0	2,9	4,0
30,36	4,5,9,10- Dehidroizolongifolen	1542														0,4
30,51	α -Kalakoren	1546	0,1	0,4	0,5	0,2	1,1	0,2	Trag	0,6	0,1	0,4	Trag	Trag	0,2	0,7
31,35	(<i>E</i>)-Nerolidol	1566	0,2		Trag	0,6	Trag		0,2		0,4	0,2	Trag	3,1	0,5	0,5
31,37	β -Kalakoren	1567		0,4				0,1								
31,59	Dodekanska kiselina	1570	0,4					0,6								
31,67	Kariolan-8-ol	1572	Trag						Trag		Trag				Trag	
31,91	AR-Tumerol	1583						0,1	0,1		0,3					
32,13	Kariofilen oksid	1585		2,1	0,1	0,5	1,7	0,5	0,6	1,3	1,0		0,2	0,6		0,3
32,23	2-Feniletil tiglat	1588									0,4					
32,31	NI	1890	0,1	0,3	0,1		0,5									
32,57	NI	1596	0,1	0,3	0,1		0,8				0,1					
32,76	Gvajol	1601	0,4		1,8					0,6			0,3			
32,81	NI	1602		0,7		0,4	0,5	0,2			0,9	0,2		0,9	0,3	
33,19	β -Oplopenon	1612	0,3													
33,20	Humulene epoksid II	1612		1,3	1,3	0,9	3,3	1,0	1,2	2,5	3,0	0,2	0,6	1,4	0,5	1,1
33,31	Tetradekanal	1615	0,1					0,1		0,6	0,1		0,1	Trag		
33,41	1,10-Diepikubenol	1617	0,1		0,5	0,1	0,2	0,2			0,1	0,3	0,1	0,1	0,2	0,3
34,10	Eremoligenol	1638	2,2		3,8	1,6	3,1	1,7	1,0	6,5	1,2	1,2	2,0	1,7	3,1	2,2
34,20	γ -Eudezmol	1641	9,7	7,2	6,1	4,3	5,5	12,7	6,0	9,7	3,9	2,7	13,3	9,2	7,4	3,4
34,39	Hinezol	1645											0,8	0,6	1,5	

Retenciono vreme (min)	Ime jedinjenja	RI	Relativni procentni udeo isparljivih jedinjenja propolisa													
			BA 1	BA 5	BA 6	BA 13	BA 17	BA 28	BA 31	BA 34	BA 35	BA 38	BA 40	BA 43	BA 45	BA 51
34,49	τ -Kadinol	1647	1,9	1,6	6,9	2,0	2,7	3,1	0,8	5,5	1,6	2,9	1,4	1,8	1,9	4,3
34,54	τ -Murolol	1648	0,5	0,8		0,3	0,3									
34,64	α -Murolol	1650		0,7	0,9						0,3	0,5	0,9	0,5	0,5	
34,68	NI	1651											0,1	0,6	0,4	
34,97	β -Eudezmol	1663	13,7	5,8	11,2	6,1	8,2	15,9	6,5	19,7	3,2	3,4	13,0	9,4	13,5	6,6
35,10	α -Eudezmol	1665	10,0	5,9	11,1	4,3	9,5	12,4	6,5	18,0	9,7	3,1	16,2	11,5	17,0	8,1
35,12	α -Kadinol	1665			3,4											
35,17	α -Bisabolol oksid B	1665		5,5		7,7			5,3			4,9				
35,27	NI	1666	0,3		0,4	0,1			0,1							0,1
35,43	NI	1669								0,5		0,1				
35,56	Bulnezol	1673	0,1			0,3							0,8	1,4	0,8	
35,57	epi- β -Bisabolol	1673		0,3		0,6					0,4	0,3				
35,59	β -Bisabolol	1674									0,7	1,2	Trag			
35,60	NI	1674	0,3				0,1	0,5	1,2							0,1
35,73	Kadalen	1676	0,1									Trag				
36,08	α -Bisabolol	1684	0,2	32,6	1,2	37,1	0,2	0,2	34,6	0,6	38,2	64,4	12,2	11,1	23,2	0,3
36,20	NI	1690					0,4	0,1								
36,61	Heptadekan	1700		0,2	0,1	0,5		0,1	0,2	0,5	0,1		Trag	0,4	0,1	
39,01	Benzil benzoat	1769	0,3	2,0	Trag	Trag		7,1		0,2	0,1		Trag	Trag	0,6	0,2
39,95	<i>trans</i> -Cinamil tiglat	1795								0,5						
40,85	Heksadekanal	1817	0,3					0,1	0,1				0,1	0,1		
42,19	2-Feniletil benzoat	1857	0,2					0,3			0,1		0,1		0,1	
42,67	Benzil salicilat	1872	0,2					0,7	0,1		0,2		0,1		0,2	
43,73	Nonadekan	1901	0,2	1,0	0,3	0,8	0,1	0,3	0,7	0,6	0,4	0,1	0,8	1,7	0,6	0,1
47,04	Eikozan	1998	0,2	0,3	Trag	0,2		Trag	0,1		0,1		0,3	0,4	0,6	
49,46	C ₁₆ H ₁₄ O ₂ ; MT=238g mol ⁻¹	2078	1,7			0,1		1,7					0,7		0,1	
49,97	Benzil estar cimetine kiseline	2095	Trag	0,3				0,6							Trag	
50,21	Heneikozan	2102	0,5	2,0	1,2	1,1	0,3	0,5	1,1	0,7	0,7	0,2	1,6	2,0	1,3	0,1

Retenciono vreme (min)	Ime jedinjenja	RI	Relativni procentni udeo isparljivih jedinjenja propolisa														
			BA 1	BA 5	BA 6	BA 13	BA 17	BA 28	BA 31	BA 34	BA 35	BA 38	BA 40	BA 43	BA 45	BA 51	
50,36	2-Nonadekanon	2107	0,1									Trag		0,1		0,2	
53,22	Dokozan	2202	0,3	0,7	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1	0,7	0,6	0,5		
55,36	Trikozen	2273	Trag	0,3	0,1	0,1		0,1	0,2		0,1		0,4	0,3	0,2		
56,17	Trikozan	2302	1,5	4,6	1,8	2,0	1,1	1,0	2,1		1,6	0,4	3,9	3,6	2,5	0,2	
57,85	NI	2359															0,7
58,96	Tetrakozan	2393	0,2	0,5	0,1	0,4	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,4	0,4		
59,25	Cinamil estar cimetine kiseline	2405	0,2			0,1		0,2		0,1	0,1		0,2		0,1		
61,70	Pentakozan	2498	0,8	2,8	1,0	1,2	0,8	0,5	1,1	0,7	0,8	0,2	2,2	2,1	1,6	0,2	
64,31	Heksakozan	2597	0,1	0,3	Trag	0,1		Trag	0,1	0,1	0,1		0,2	0,2	0,1		
65,07	NI	2631															0,8
66,86	Heptakozan	2700	0,7	4,2	0,8	1,8	0,5	0,5	1,2	0,7	0,6	0,2	2,0	1,8	1,9	Trag	
70,81	NI	2872											0,5	Trag	Trag	0,3	
71,67	Nonakozan	2902	0,2	1,6	0,2	0,5	0,1	0,1	0,4	0,1	0,1		0,3	0,3	0,7		
76,11	Untriakontan	3103	0,1	0,7	0,1	0,5		0,1	0,2	Trag	Trag	Trag	0,1	0,1	0,3		
Ukupno neidentifikovano			6,5	1,3	2,4	0,8	3,7	4,0	4,1	1,2	1,8	0,9	6,0	3,4	1,9	4,0	

RI – retencioni indeks, NI – Nije identifikovano, Trag – komponente prisutne u koncentraciji manjoj od 0,1%

4.1.2.1 Određivanje komponenti voskova ekstrahovanih iz propolisa

Za potrebe analize komponenti prisutnih u uzorcima voska korišćeni su heksanski reekstrakti ostataka metanolne ekstrakcije uzoraka propolisa. Dobijeni heksanski ekstrakti su proceđeni na filter-papiru i upareni do suva. Uzorci voska su podvrgnuti postupku bazne hidrolize i dobijeni alkoholi i kiseline su potom silanizovani [108]. Ovako pripremljeni trimetilsilil derivati su analizirani GC-FID/MS tehnikom. Poređenjem sa bazama podataka retencionih indeksa i masenih spektara identifikovano je 38 jedinjenja (Tabela 5).

Tabela 5. Relativni procentni udeli komponenti odabranih uzoraka voskova nakon reakcije silanizovanja dobijeni GC-FID/MS analizom.

RI	Naziv jedinjenja	Bruto formula	Relativni procentni udeo voskova dobijen nakon silanizovanja														
			BA1	BA5	BA6	BA8	BA17	BA18	BA28	BA30	BA31	BA34	BA35	BA39	BA40	BA43	BA45
1908	Metilestar palmitinske kiseline	$C_{17}H_{34}O_2$	0,31		8,06	0,07	8,74	0,18	1,79	5,97	6,68	14,66	0,13	0,03	0,15	0,18	0,33
2039	Trimetilsilil estar palmitinske kiseline	$C_{19}H_{40}O_2Si$	0,97	2,81	3,10	1,46	1,41	0,45	1,01	0,85	0,40	0,35	1,32	0,05	1,97	2,15	1,00
2084	Metilestar oktadecenske kiseline	$C_{19}H_{38}O_2$	0,55		0,69	0,21	1,41	0,27	0,64	1,54	2,14	5,98	0,27	0,26	0,34	0,41	0,56
2100	Heneikosan	$C_{21}H_{44}$					0,24			0,17	0,27	0,05	Trag				
2200	Dokozan	$C_{22}H_{46}$	0,11			0,32	0,11	0,17	0,23	0,31	0,12	0,10	Trag	0,07	0,10	0,09	0,10
2224	Trimetilsilil estar (Z)-11-oktadecenske kiseline	$C_{21}H_{42}O_2Si$	0,21			0,29	0,22	0,13	0,40	0,24	0,21	0,17	Trag	Trag	0,54	0,48	0,21
2236	Trimetilsilil estar stearinske kiseline	$C_{21}H_{44}O_2Si$				0,10	0,09	0,03					0,37		0,09	0,12	
2271	Trikozen	$C_{23}H_{46}$												0,07	0,06	0,10	
2300	Trikozan	$C_{23}H_{48}$	2,96	2,12	1,66	2,76	1,74	1,97	2,27	1,84	2,92	3,16	3,20	3,03	2,48	3,15	2,99
2322	Metilestar eikozanske kiseline	$C_{21}H_{42}O_2$					0,08			0,07	Trag	0,11	Trag				
2348	Trimetilsilil-1-unkosanil etar	$C_{23}H_{44}OSi$	0,16	0,64		0,48	0,40	0,20	0,19	0,25	0,17	0,09		0,09	0,16	0,11	

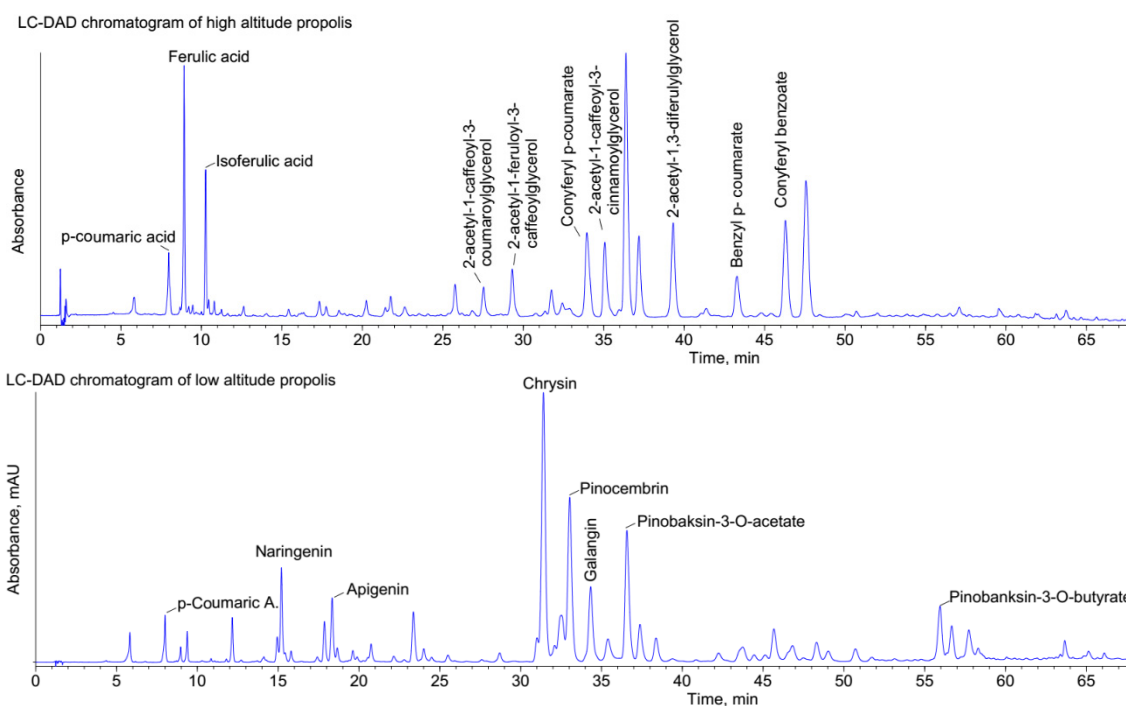
RI	Naziv jedinjenja	Bruto formula	Relativni procentni udeo voskova dobijen nakon silanizovanja														
			BA1	BA5	BA6	BA8	BA17	BA18	BA28	BA30	BA31	BA34	BA35	BA39	BA40	BA43	BA45
2400	Tetrakozan	C ₂₄ H ₅₀	0,98	0,74		0,47	0,36	0,28	0,32	0,27	0,60	0,67	0,56	0,55	0,48	0,55	0,99
2470	Pentakozen	C ₂₅ H ₅₀	0,13						0,17	0,19	0,24				0,19	0,23	
2500	Pentakozan	C ₂₅ H ₅₂	6,07	5,30	3,09	6,10	5,18	4,35	4,48	3,84	6,06	6,44	6,26	6,84	5,35	7,25	6,14
2527	Heptakozen	C ₂₆ H ₅₂	0,20			0,34	0,09	0,16	0,19						0,39	0,36	
2550	Trimetilsilil-1-dokozanil etar	C ₂₅ H ₅₄ OSi	0,19			0,70	0,48	0,31	0,30	0,24	0,19	0,12	0,42	0,15	0,26	0,19	
2600	Heksakozan	C ₂₆ H ₅₄	1,38	1,85		1,09	0,66	0,68	0,53	0,52	1,21	1,21	0,92	1,03	0,87	1,08	1,32
2700	Heptakozan	C ₂₇ H ₅₆	19,61	11,80	9,42	16,40	11,49	17,36	14,84	12,32	19,34	23,61	19,14	21,75	18,48	25,24	19,94
2749	Trimetilsilil-1-tetrakozanil etar	C ₂₇ H ₅₈ OSi	13,71	16,38	15,20	18,65	13,75	24,51	22,26	17,50	15,10	7,62	15,41	16,48	20,77	15,43	13,96
2800	Oktakozan	C ₂₈ H ₅₈	1,09	1,79		0,97	0,62	0,72		0,52	1,05	0,94	0,75	0,86	0,71	0,84	1,11
2829	Trimetilsilil estar tetrakozanske kiseline	C ₂₇ H ₅₆ O ₂ Si	0,34	0,26		0,29	0,44					0,03	0,13		0,65	0,86	
2882	Nonakozen	C ₂₉ H ₅₈	0,13			0,19									0,15	0,26	
2900	Nonakozan	C ₂₉ H ₆₀	13,24	8,93	6,28	10,19	6,20	12,45	9,36	8,26	11,98	12,89	12,03	12,17	10,50	12,19	13,48
2935	Trimetilsilil-1-heksakozanil etar	C ₂₉ H ₆₂ OSi	7,54	10,21	12,52	10,55	10,34	11,53	11,14	10,63	7,17	3,16	7,26	8,76	9,83	6,76	7,69
3000	Trikontan	C ₃₀ H ₆₂	0,60	1,15		0,44	0,44	0,44		0,25	0,62	0,46	0,55	0,52	0,40	0,40	0,61
3083	Hentrikonten	C ₃₁ H ₆₂	1,61	1,33	1,36	1,94	0,88	1,22	1,63	1,68	2,19	1,87	2,13	1,76	1,39	1,46	1,61
3089			1,65	1,20	1,22	1,71	0,94	0,67	1,45	1,57	2,11	1,69	1,94	1,64	1,32	1,34	1,63

RI	Naziv jedinjenja	Bruto formula	Relativni procentni udeo voskova dobijen nakon silanizovanja														
			BA1	BA5	BA6	BA8	BA17	BA18	BA28	BA30	BA31	BA34	BA35	BA39	BA40	BA43	BA45
3100	Hentrikontan	C ₃₁ H ₆₄	7,46	6,30	3,67	4,97	3,76	7,31	6,02	4,84	6,50	5,90	7,17	6,47	5,47	5,28	7,61
3154	Trimetilsilil-1-oktakosanil etar	C ₃₁ H ₆₆ OSi	4,83	8,12	10,81	5,82	8,51	5,45	5,84	7,09	3,01	1,38	4,51	4,88	5,08	3,18	4,91
3200	Dotrikontan	C ₃₃ H ₆₆					0,20		0,10		0,21	0,11	0,20	0,15		0,12	
3278			0,28				0,28	0,03	0,45	0,42	0,55					0,17	
3283	Tritrikonten	C ₃₃ H ₆₆	4,52	3,85	4,21	4,93	3,60	1,71	4,60	4,42	4,46	4,22	6,04	4,69	3,56	3,51	4,71
3287			0,25				0,22	0,03	0,25	0,21		0,51					
3300	Tritrikontan	C ₃₃ H ₆₈	0,82			0,52	0,57	0,72	0,75	0,65	0,70	1017	0,87	0,69	0,54	0,56	0,86
3333	Trimetilsilil-1-triakontanil etar	C ₃₃ H ₇₀ OSi	4,92	10,59	13,69	5,35	10,82	4,26	5,54	8,58	2,26	0,20	5,13	4,57	4,74	3,17	5,03
3520	Heksatrikontan	C ₃₆ H ₇₂	0,40	0,28	0,07	0,30	0,24	0,34	0,55	0,50	0,28	0,47	0,68	0,32	0,32	0,37	0,41
3530	Trimetilsilil-1-dotriakontanil etar	C ₃₅ H ₇₄ OSi	2,14	3,70	4,94	2,08	3,99	1,47	2,14	3,96	0,79		1,90	1,74	2,03	1,58	2,16
3700	Heptatrikontan	C ₃₇ H ₇₆	Trag	Trag	Trag	Trag	Trag	0,01	Trag	Trag	Trag	Trag	Trag	Trag	0,01	Trag	Trag

RI – retencioni indeks, NI – Nije identifikovano, Trag – komponente prisutne u koncentraciji manjoj od 0,01%

4.2 Primena rezultata NMR, FTIR i UV spektroskopskih tehnika u multivarijantnoj analizi propolisa

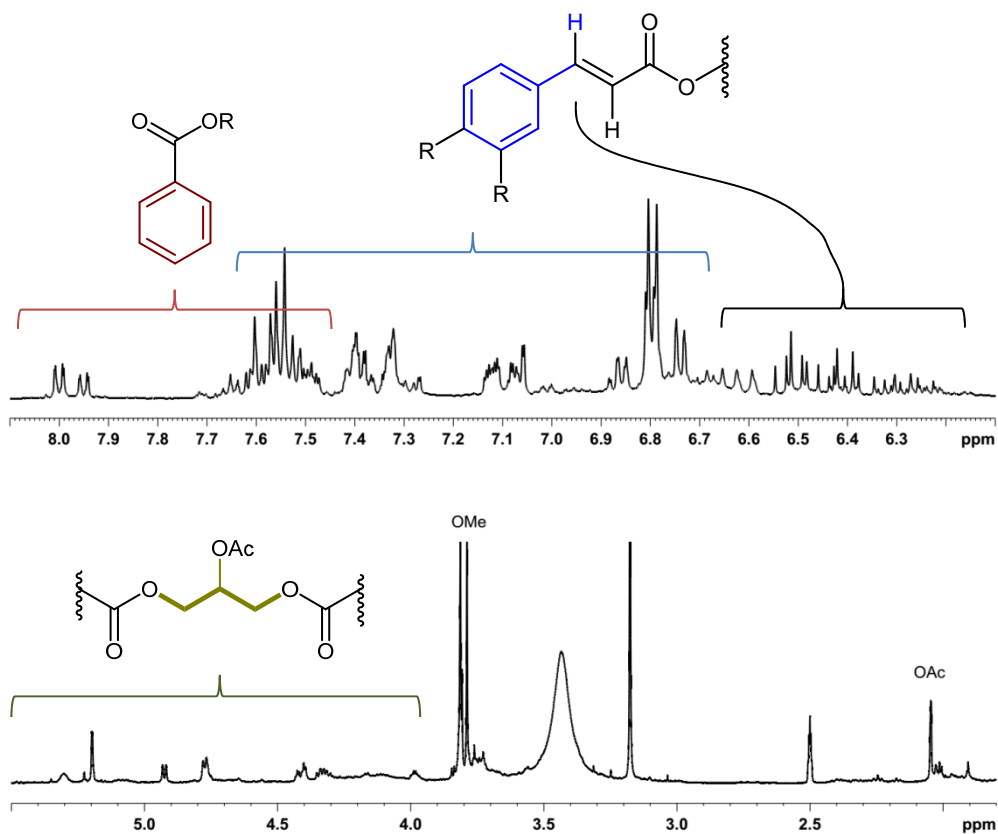
Za potrebe multivarijantne analize snimljeni su NMR, IR i UV spektri metanolnih ekstrakata svih prikupljenih uzoraka propolisa. Za identifikaciju pojedinačnih komponenti korišćene su 1D i 2D NMR spektroskopske tehnike u kombinaciji sa rezultatima LC/MS analize, kako i njihovo poređenje sa spektrima standarda (dati u prilogu) i relevantnim podacima iz literature [99–107] Slika 8.



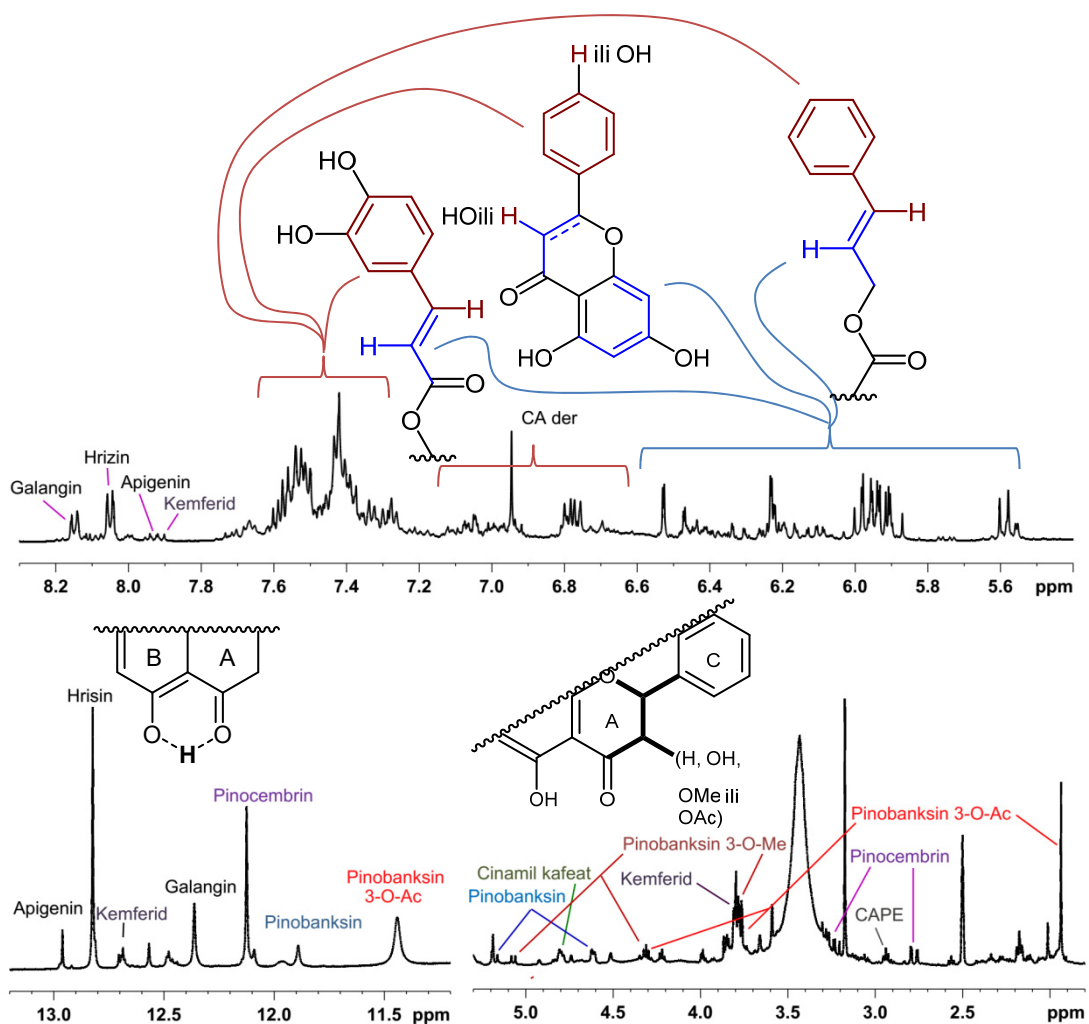
Slika 8. HPLC-DAD hromatogrami reprezentativnih uzoraka propolisa prikupljenih iznad 500 m nadmorske visine (gornji hromatogram uzorka BA 5) i ispod 400 m nadmorske visine (donji hromatogram uzorka BA 18).

U ^1H NMR spektru signali u oblasti od 2 do 4,5 ppm prevashodno potiču od protona glicerola iz glicerol estara, singleti metoksi protona flavonoida i fenolnih kiselina, signali iz A prstena (protoni u položajima 2 i 3) flavanona i izoprenske jedinice prenil estra kafene kiseline (CAPE) (Slike 9 i 10). Na hemijskim pomeranjima između 5 i 8,5 ppm se nalaze signali aromatičnih i vinilnih protona fenolnih kiselina kao i protoni iz B i C prstena flavonoida (Slike 9 i 10). Singleti u oblasti od 11 do 14 ppm potiču od protona OH grupa u položaju 5 (B prsten). Njihovo visoko hemijsko pomeranja je posledica intramolekulskog vodoničnog vezivanja sa kiseonikom keto grupe u položaju

4 (Slika 10). Svaki od flavonoida sa OH grupom u položaju 5 daje karakteristično hemijsko pomeranje ovog signala, te se na osnovu istog može tentativno odrediti njegovo prisustvo. Pojedinačni signali u ^1H NMR spektrima su pripisani signalima identifikovanih jedinjenja poređenjem sa spektrima standarda i/ili detaljnom analizom 2D spektralnih podataka.



Slika 9. Uvećani delovi ^1H NMR spektra reprezentativnog uzorka propolisa (BA 5) prikupljenih iznad 500 m nadmorske visine sa prikazom porekla signala u delovima strukture prisutnih komponenti.



Slika 10. Uvećani delovi ¹H NMR spektra reprezentativnog uzorka propolisa (BA 18) prikupljenih ispod 400 m nadmorske visine sa prikazom porekla signala u delovima strukture prisutnih komponenti.

Signali dobijeni snimanjem 2D NMR tehnika (COSY, NOESY, TOCSY, HSQC, HMBC i JRES) su korišćeni za dodatnu potvrdu u slučaju preklapanja signala u ¹H NMR spektrima (dati u prilogu). Hemijska pomeranja, oblik signala i konstante kuplovanja su dobijeni analizom 2D J razloženih spektara (JRES). Na ovaj način u ¹H NMR spektrima su identifikovane 23 komponente, i to: 9 flavonoida, 11 fenolnih kiselina i njihovih estara i 3 glicerol estra fenolnih kiselina (Tabela 6).

Tabela 6. Spektralni podaci komponenti propolisa identifikovanih NMR spektroskopskim tehnikama.

Jedinjenje	Hemijsko pomeranje (ppm)
Hzirin	δ 12,82 (s), δ 8,05 (m), δ 7,56 (m), δ 6,95 (s), 6,53 (d, $J=2,0$ Hz), δ 6,23 (d, $J=2,0$ Hz).
Galangin	δ 12,36 (s), δ 8,15 (m), δ 7,52 (m), 6,47 (d, $J=2,0$ Hz), δ 6,22 (d, $J=2,0$ Hz).
Pinobanksin	δ 11,89 (s), δ 7,52 (m), δ 7,41 (m), δ 5,90 (br s), 5,87 (br s), δ 5,17 (d, $J=11,3$ Hz), δ 4,61 (d, $J=11,3$ Hz).
Pinocembrin	δ 12,12 (s), δ 7,52 (m), δ 7,41 (m), 5,93 (d, $J=2,2$ Hz), δ 5,91 (d, $J=2,2$ Hz), δ 5,57 (dd, $J=12,3, 2,8$ Hz), δ 3,23 (dd, $J=17,1, 12,7$ Hz), δ 2,78 (dd, $J=17,1, 2,8$ Hz).
Pinobanksin 3-O-acetat	δ 11,44 (s), δ 7,53 (m), δ 7,43 (m), δ 5,98 (d, $J=2,2$ Hz), 5,95 (d, $J=2,2$ Hz), δ 5,93 (d, $J=11,8$ Hz), 5,59 (d, $J=11,8$ Hz), δ 1,94 (s).
Pinobanksin 3-O-metilestar	δ 7,49 (m), δ 7,40 (m), δ 6,11 (d, $J=2,1$ Hz), 5,95 (d, $J=2,1$ Hz), δ 5,07 (d, $J=11,8$ Hz), 4,33 (d, $J=11,8$ Hz), δ 3,77 (s).
Kemferid	δ 12,69 (s), δ 7,91 (d, $J=9,0$ Hz), δ 6,93 (d, $J=9,0$ Hz), 6,35 (d, $J=2,2$ Hz), δ 6,09 (d, $J=2,2$ Hz), δ 3,77 (s).
Apigenin	δ 12,96 (s), δ 7,93 (d, $J=9,1$ Hz), δ 6,95 (d, $J=9,1$ Hz), 6,76 (s), δ 6,48 (d, $J=2,0$ Hz), δ 6,20 (d, $J=2,0$ Hz).
Naringenin	δ 7,31 (AA'BB'), δ 6,79 (AA'BB'), δ 5,89 (S), δ 5,43 (dd, $J=12,6, 2,8$ Hz), δ 3,26 (dd, $J=17,1, 12,6$ Hz), δ 2,68 (dd, $J=17,1, 2,8$ Hz).
Kafena kiselina	δ 7,42 (d, $J=16,0$ Hz), δ 7,05 (d, $J=1,8$ Hz), 6,98 (dd, $J=8,1, 1,8$ Hz), δ 6,77 (d, $J=8,1$ Hz), δ 6,18 (d, $J=16,0$ Hz).
Benzil estar kafene kiseline	kafeinski deo: δ 7,52 (d, $J=15,9$ Hz), δ 7,05 (d, $J=1,8$ Hz), 7,00 (dd, $J=8,1, 1,8$ Hz), δ 6,76 (d, $J=8,1$ Hz), δ 6,32 (d, $J=15,9$ Hz). benzil deo: 7,38 (m), 5,19 (s).
Prenil estar kafene kiseline (CAPE)	kafeinski deo: δ 7,52 (d, $J=15,9$ Hz), δ 7,04 (d, $J=1,8$ Hz), 7,01 (dd, $J=8,1, 1,8$ Hz), δ 6,79 (d, $J=8,1$ Hz), δ 6,32 (d, $J=15,9$ Hz). prenilni deo: δ 7,26 (m), δ 4,31 (t, $J=6,9$ Hz), δ 2,94 (t, $J=6,9$ Hz).
Cinamil estar kafene kiseline	kafeinski deo: δ 7,46 (d, $J=15,9$ Hz), δ 7,05 (d, $J=1,8$ Hz), 7,01 (dd, $J=8,1, 1,8$ Hz), δ 6,76 (d, $J=8,1$ Hz), δ 6,25 (d, $J=15,9$ Hz). cinamil deo: δ 7,46 (m), δ 6,71 (dt, $J=16,0, 1,8$ Hz), δ 6,42 (dt, $J=16,0, 6,2$ Hz), δ 4,80 (dd, $J=6,2, 1,8$ Hz).
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	δ 7,51 (d, $J=8,2$ Hz), δ 7,49 (d, $J=16,0$ Hz), 6,78 (d, $J=8,2$ Hz), δ 6,29 (d, $J=16,0$ Hz).
Ferulinska kiselina	δ 7,49 (d, $J=16,0$ Hz), δ 7,27 (d, $J=2,0$ Hz), 7,08 (dd, $J=8,1, 2,0$ Hz), δ 6,79 (d, $J=8,1$ Hz), δ 6,36 (d, $J=16,0$ Hz), 3,81 (s).
Benzoeva kiselina	δ 7,49 (dd, $J=8,6, 1,2$ Hz), δ 7,61 (tt, $J=7,5, 1,2$ Hz), δ 7,95 (dd, $J=8,6, 7,5$ Hz).
Koniferil estar benzoeve kiseline	benzilni deo: δ 8,00 (dd, $J=8,6, 1,2$ Hz), δ 7,65 (tt, $J=7,5, 1,2$ Hz), δ 7,53 (dd, $J=8,6, 7,5$ Hz). koniferilni deo: δ 7,08 (d, $J=1,9$ Hz), δ 6,87 (dd, $J=8,1, 1,9$ Hz), δ 6,75 (d, $J=8,1$ Hz), δ 6,67 (dt, $J=15,9, 1,8$ Hz), δ 6,31 (dt, $J=15,9, 6,5$ Hz), δ 4,93 (dd, $J=6,5, 1,8$ Hz), 3,79 (s).

Jedinjenje	Hemijsko pomeranje (ppm)
Koniferil estar <i>p</i> -kumarinske kiseline	<i>p</i> -kumarinski deo: δ 7,60 (d, <i>J</i> =15,8 Hz), δ 7,55 (d, <i>J</i> =8,2 Hz), 6,80 (d, <i>J</i> =8,2 Hz), δ 6,53 (d, <i>J</i> =15,8 Hz). koniferilni deo: δ 7,05 (d, <i>J</i> =1,9 Hz), δ 6,86 (dd, <i>J</i> =8,1, 1,9 Hz), δ 6,74 (d, <i>J</i> =8,1 Hz), δ 6,61 (dt, <i>J</i> =15,9, 1,8 Hz), δ 6,24 (dt, <i>J</i> =15,9, 6,5 Hz), δ 4,77 (dd, <i>J</i> =6,5, 1,8 Hz), 3,79 (s).
Benzil estar <i>p</i> -kumarinske kiseline	<i>p</i> -kumarinski deo: δ 7,58 (d, <i>J</i> =16,0 Hz), δ 7,53 (d, <i>J</i> =8,2 Hz), 6,80 (d, <i>J</i> =8,2 Hz), δ 6,49 (d, <i>J</i> =16,0 Hz). benzilni deo : δ 7,35-7,43 (m), δ 5,20 (AB).
Benzil estar ferulinske kiseline	Ferulinski deo: δ 7,60 (d, <i>J</i> =16,0 Hz), δ 7,32 (d, <i>J</i> =2,0 Hz), 7,13 (dd, <i>J</i> =8,1, 2,0 Hz), δ 6,80 (d, <i>J</i> =8,1 Hz), δ 6,41 (d, <i>J</i> =16,0 Hz), 3,81 (s). benzilni deo: δ 7,35-7,43 (m), δ 5,23 (br s).
1,3-Diferuloil-2-acetil-glicerol estar	Ferulinski deo: δ 7,59 (d, <i>J</i> =16,0 Hz), δ 7,32 (d, <i>J</i> =2,0 Hz), 7,13 (dd, <i>J</i> =8,1, 2,0 Hz), δ 6,80 (d, <i>J</i> =8,1 Hz), δ 6,50 (d, <i>J</i> =16,0 Hz), 3,81 (s). 2-acetil-glicerolni deo: δ 5,30 (m), δ 4,42 (dd, <i>J</i> =12,0, 3,8 Hz), 4,33 (dd, <i>J</i> =12,0, 6,1 Hz), δ 2,05 (s).
1- <i>p</i> -Kumaroil-2-acetil-3-feruloil-glicerol estar	<i>p</i> -kumarinski deo: δ 7,59 (d, <i>J</i> =16,0 Hz), δ 7,49 (d, <i>J</i> =8,1 Hz), 6,79 (d, <i>J</i> =8,1 Hz), δ 6,4 (d, <i>J</i> =16,0 Hz). Ferulinski deo: δ 7,59 (d, <i>J</i> =16,0 Hz), δ 7,32 (d, <i>J</i> =2,0 Hz), 7,12 (dd, <i>J</i> =8,1, 2,0 Hz), δ 6,79 (d, <i>J</i> =8,1 Hz), δ 6,50 (d, <i>J</i> =16,0 Hz), 3,81 (s). 2-acetil-glicerolni deo: δ 5,30 (m), δ 4,41 (m), 4,33 (m), δ 2,05 (s).
1,3-Di- <i>p</i> - kumaroil -2-acetil-glicerol estar	<i>p</i> -kumarinski deo: δ 7,59 (d, <i>J</i> =16,0 Hz), δ 7,55 (d, <i>J</i> =8,1 Hz), 6,79 (d, <i>J</i> =8,1 Hz), δ 6,4 (d, <i>J</i> =16,0 Hz). 2-acetil-glicerolni deo: δ 5,30 (m), δ 4,41 (m), 4,33 (dd, <i>J</i> =12,0, 6,1 Hz), δ 2,05 (s).

Signali glavnih komponenti su takođe detektovani i asignirani u IR spektrima propolisa. Postupak dekonvolucije signala je primenjen kako bi preklopljene trake u uzorcima bile uočljivije. Poređenjem talasnih brojeva tako dobijenih traka u uzorcima i standardima izvršena je identifikacija pojedinačnih glavnih komponenti (Tabele 7 i 8).

Tabela 7. Spektralni podaci glavnih komponenti uzorka propolisa BA 5 (prikupljen na 550 m nadmorske visine u selu Vukanja, palnina Jastrebac) identifikovanih nakon dekonvolucije IR spekara.

1- <i>p</i> -Kumaroil-2-acetil-3-feruloil-glicerol estar	1,3-Di- <i>p</i> -kumaroil-2-acetil-glicerol estar	Koniferil-benzoat	<i>p</i> -Kumaroil-benzoat	BA 5
1745	1743			1739
1717		1716		1715
	1709	1704		
1692		1693	1688	1694
		1679	1672	1677
	1664			
		1655		
1632	1632	1629	1635	1632
1604		1600	1600	1604
1592	1594	1584	1588	1589
	1558		1555	1557
1514	1515	1515	1517	1515
1490	1496	1503	1501	
	1460		1462	1465
1446	1450	1453	1443	
	1429	1428		1432
1377	1378	1375	1376	1376
1327	1325		1326	1321
			1311	
	1280		1282	
1271		1270		1270
	1247			
1237		1239	1232	1237
	1225			
1203		1208	1204	1207
				1186
		1178	1175	1171
1165				
	1159	1158	1149	1158
	1125	1119		1122
1107			1103	
	1097	1099		1100
		1069		1070
1058				
	1050			
1024	1027	1028		1031
			1015	
	995	996		
980			982	981
	965	967	966	
940		933		
866		862		
	850			
832				834

1- <i>p</i> -Kumaroil-2-acetil-3-feruloil-glicerol estar	1,3-Di- <i>p</i> -kumaroil-2-acetil-glicerol estar	Koniferil-benzoat	<i>p</i> -Kumaroil-benzoat	BA 5
	821	826	823	817
		802		
	768		755	
	710	713		714
			697	

Tabela 8. Spektralni podaci glavnih komponenti uzorka propolisa BA 18 (prikupljen na 200 m nadmorske visine u okolini Novog Sada) identifikovane nakon dekonvolucije IR spekara.

Pinobanksin -3-O-Ac	Pinobanksin -3-O-Me	Benzilkafeat	Pinocembrin	Pinobanksin	Hrizin	Galangin	BA 18
1745	1739	1751					1761
							1729
1706	1713	1706	1706	1707			1710
1684	1693						1690
	1673						
	1653			1652	1648	1660	1657
1634	1632	1641	1643	1632		1634	1637
	1612	1620	1620				
1599				1600	1606	1607	1608
	1586	1590	1589		1578		1585
1560	1562				1554	1563	1556
	1540	1545	1548	1544			
					1530		
1519	1515			1516		1522	1514
1493	1499	1505	1498	1500	1502	1494	1497
					1481		
1466	1471	1472	1466	1473		1473	1469
1448	1450	1451	1448	1452	1447	1452	1447
						1440	
	1429			1429			
		1419			1423		
	1391		1410	1404		1411	1412
1380		1373	1375	1371	1374	1375	1376
	1358				1355		1356
1345	1333		1346	1345			1339
1310		1314	1318	1318	1312	1315	1309
	1293		1299				
1282		1288		1286		1286	1283
			1276		1275		
1257		1256		1255		1260	1259
	1245		1248		1247		
1232					1228		1225
		1222	1218	1221		1220	
1207	1208				1200	1197	

Pinobanksin -3-O-Ac	Pinobanksin -3-O-Me	Benzilkafeat	Pinocembrin	Pinobanksin	Hzizin	Galangin	BA 18
	1188			1190			1190
1179		1183	1183			1176	
	1165	1164	1164	1169	1168	1165	1161
1155					1155		
	1136						
1116	1107	1122	1122	1125	1123	1125	1115
					1103	1095	
1087	1081	1088	1088	1090			1081
					1077		
		1068	1066			1070	
1051	1049		1049	1050	1047		
		1037				1034	1034
1023	1026	1023	1025	1025	1028		
						1009	
997	997		994	997	998		999
	976	986		973	970	973	979
939	948						
		925	926	924			
908	917				909		
			890				
882	877	877		879	874	881	878
855			861			854	
					841		836
	828	830	828	830		819	
817				805	807	794	813
786	771				781		
763		770	773	768		768	767
	756				755		
740			747	742		740	742
		735					
			722		724		
698	700	701	702	707	696	701	699
	674	679		686	674		679
		655					
	640	633	640	635	642	636	641

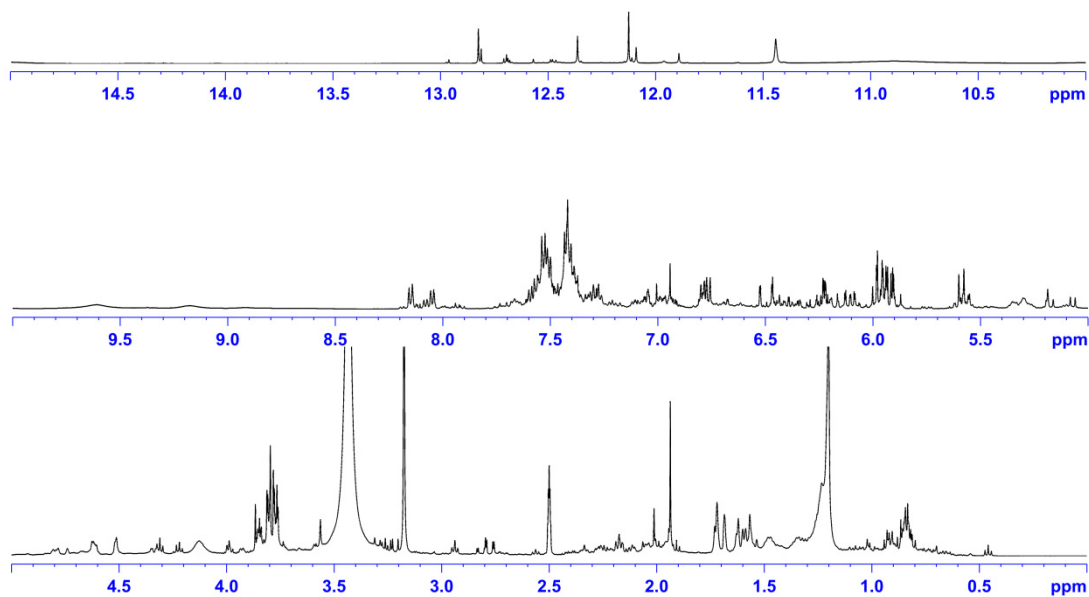
Na osnovu literaturnih podataka pripisano je poreklo odgovarajućih traka u IR spektrima [109–111]. Istežuće vibracione trake u oblasti od 1760 do 1650 cm^{-1} potiču od karbonilnih grupa estara i karboksilnih grupa fenolnih kiselina i flavonoida. Trake u oblasti od 1650 do 1460 cm^{-1} potiču od istežućih vibracija dvostruke veze i aromatičnih prstenova. Deformacione C–H i O–H vibracije u ravni prstena prisutne su u oblasti od 1470 do 1330 cm^{-1} . Jake trake u oblasti od 1280 do 1160 cm^{-1} potiču od C–O istežućih vibracija etarskih i fenolnih grupa.

UV spektri uzoraka propolisa pokazuju karakteristične apsorpcione maksimume koji odgovaraju elektronskim prelazima karakterističnim za flavonoide (pre svega hrizina, galangina, pinocembrina i pinobanksin 3-*O*-acetata) i acilgliceride fenolnih kiselina i fenilpropanoide.

4.2.1 Promene hemijskog sastava propolisa u zavisnosti od nadmorske visine

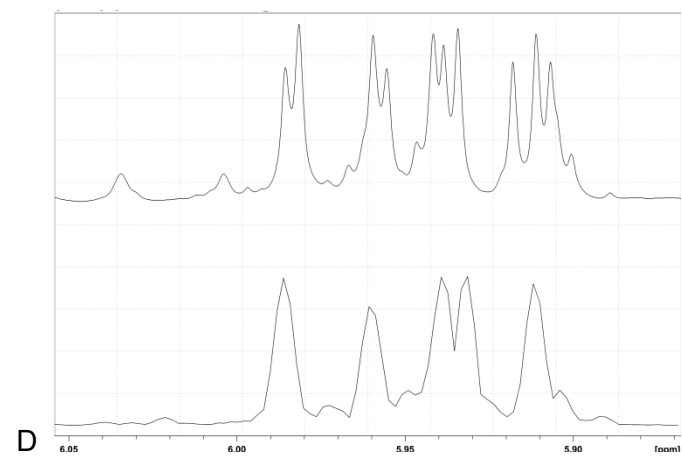
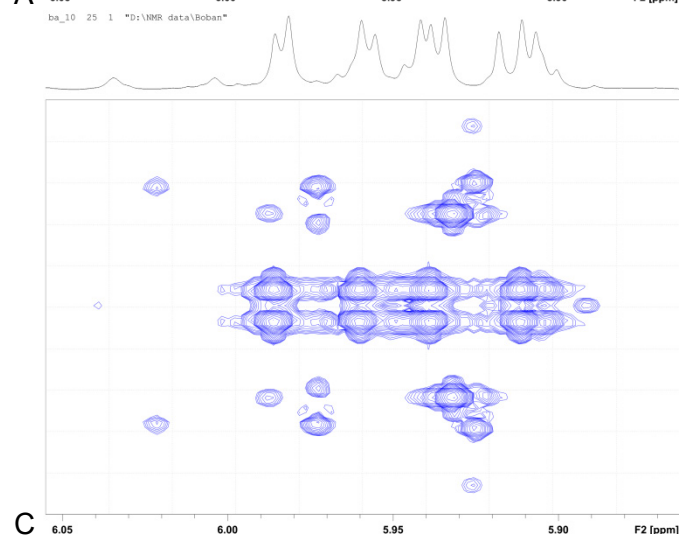
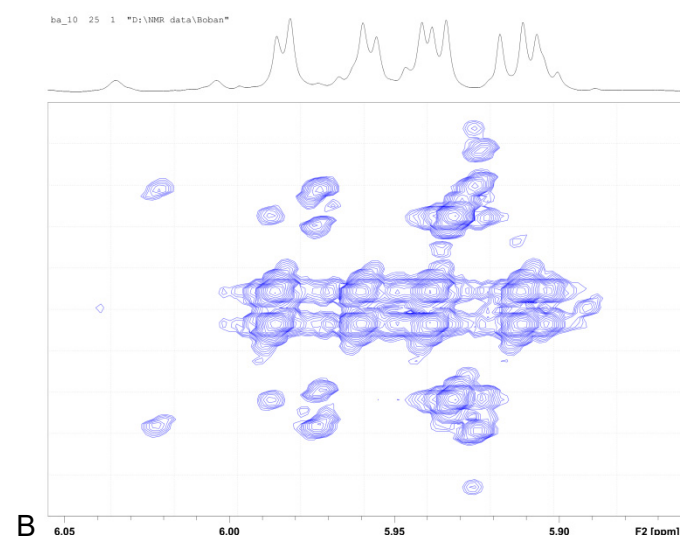
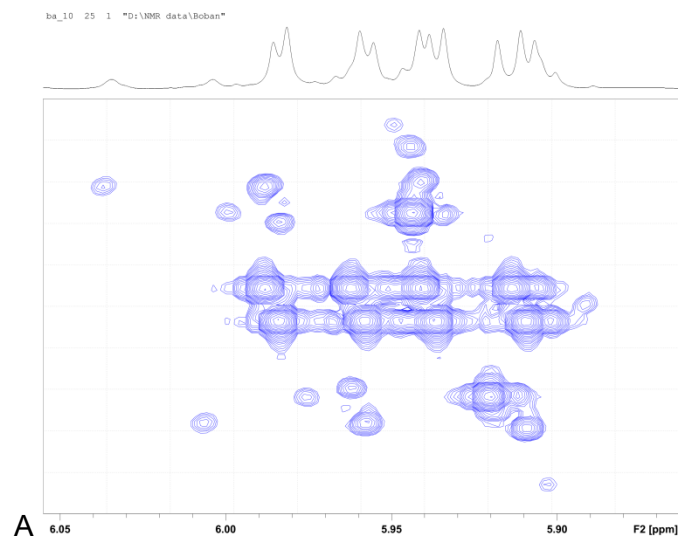
Praćenje promena u hemijskom sastavu propolisa u zavisnosti od nadmorske visine na kojoj je obavljena paša pčela zahteva kako kvalitativno tako i kvantitativno poređenje prikupljenih uzoraka. Ispunjavanje ovih zahteva je osnov biljne i humane metabolomike gde se kao metode od izbora vrlo često koristi ^1H NMR spektroskopija u kombinaciji sa multivarijantnom analizom. Iako su hromatografske tehnike superiorne u odnosu na NMR kada je osetljivost u pitanju, glavna prednost i razlog zašto se NMR obilato koristi kao metoda od izbora u metabolomičkim studijama je činjenica da su površine ispod signala svakog od protona proporcionalne molarnim koncentracijama komponente od koje potiču. Na ovaj način je moguće direktno, bez konstruisanja kalibracionih krivih porediti iste i/ili različite komponente istovremeno.

Uvidom u ^1H NMR spektre metanolnih ekstrakata uzoraka propolisa evidentno je prisustvo velikog broja srodnih komponenti sličnih NMR karakteristika (Slika 11).



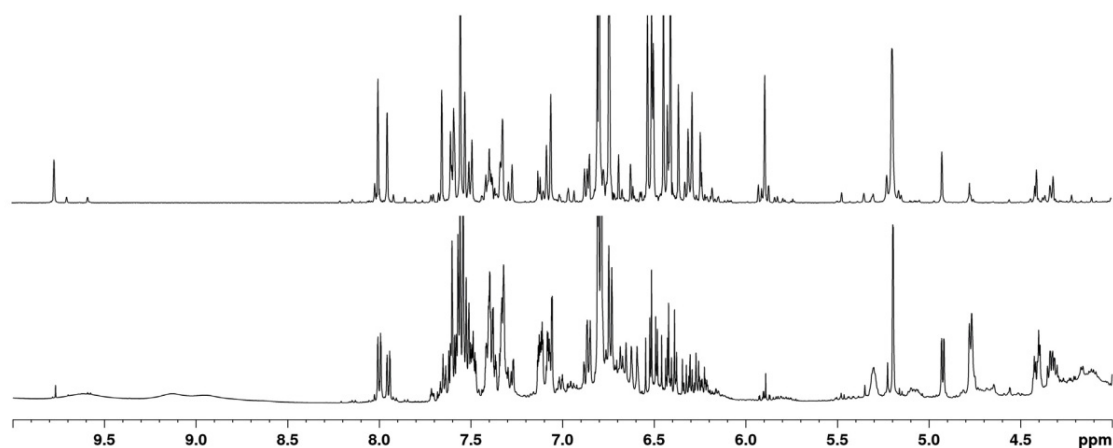
Slika 11. Reprezentativni ^1H NMR spektar metanolnog ekstrakta uzorka propolisa BA10 snimljen u DMSO-d_6 .

Posledica toga je delimično i/ili potpuno preklapanje signala različitih komponenti čime je otežano određivanje diskriminišućih komponenti posle multivarijantne analize. Primenom 2D NMR metoda moguće je prevazići ovaj problem, ali kod većine njih problem predstavlja dužina snimanja. Pored ^1H NMR spektara za potrebe ovog rada snimljeni su i 2D J razloženi NMR spektri svakog od metanolnih ekstrakata uzoraka propolisa. Zarad multivarijantne analize u $J\text{RES}$ NMR spektrima izvršena je rotacija signala za 45° , njihova simetrizacija i projekcija po F2 frekventnoj osi (p $J\text{RES}$) (Slika 12).



Slika 12. Izgled dela $2D_J$ razloženog spektra (A), nakon rotiranja za 45° (B), simetrizovanja (C) i projekcije po F2 u odnosu na 1H NMR spektra (D).

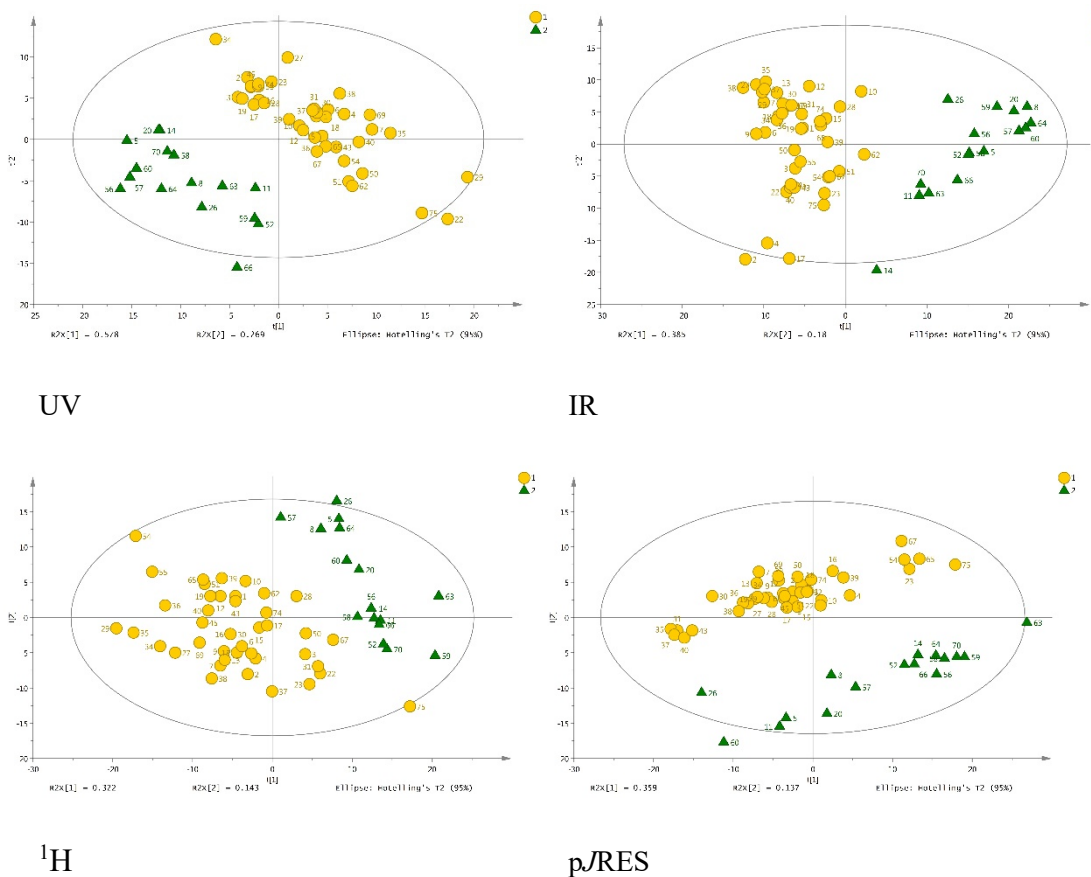
Krajnji rezultat obrade su pJERS u širokom opsegu dekuplovani homonuklearni 1D spektri. Za razliku od tipičnog ^1H NMR spektra u pJERS spektrima svi signali su po obliku singleti te je njihovo preklapanje u znatnoj meri smanjeno i spektar uprošćen [112]. Široki signali iz ^1H NMR spektra izostaju u pJERS spektrima te je bazna linija ravna. Ovako pojednostavljeni pJERS spektri sa ravnom baznom linijom su pogodniji za multivarijantnu analizu i tumačenje dobijenih rezultata (Slika 13).



Slika 13. pJRES (gore) i ^1H NMR (dole) spektri metanolnog ekstrakta uzorka propolisa BA5 snimani u DMSO-d_6 .

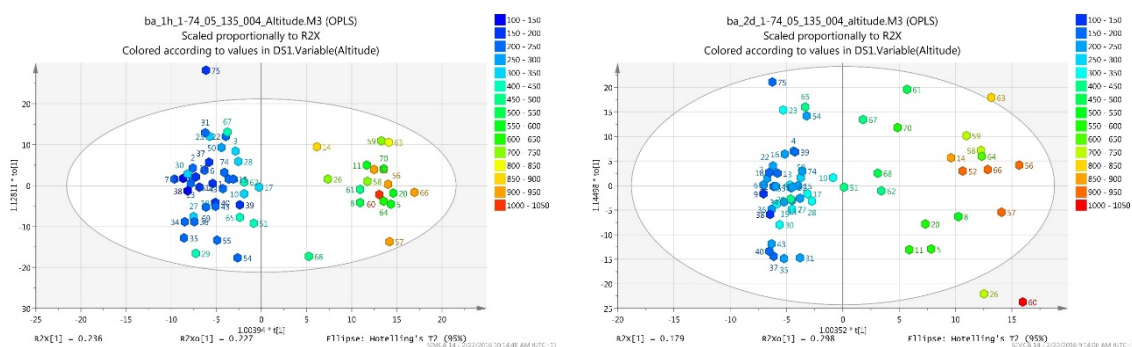
Da bi se jasnije videle promene u varijabilnosti komponenti u ispitivanim uzorcima propolisa korišćene su statističke metode: analiza glavnih komponenti (PCA) i metoda analize ortogonalne parcijalne regresije najmanjih kvadrata skrivenih struktura (OPLS). PCA je unapred-nedefinisana metoda kojom se maksimalno smanjuje ogromna količina podataka, u ovom slučaju rezultata UV, IR i NMR spektroskopskih tehnika, uz minimalan gubitak informacija o njima.

U grafiku rezultata PCA analize, nezavisno od primenjene tehnike, uočavaju se dve grupe uzoraka prikupljenih na različitim nadmorskim visinama, sa jasnom granicom između njih (Slika 14).



Slika 14. Grafici rezultata UV, IR, ¹H i p/RES NMR spektroskopskih tehnika, PCA analize uzoraka propolisa prikupljenih iznad 500 m nadmorske visine (obojeni zeleno) i ispod 450 m nadmorske visine (obojeni žuto).

OPLS je primenjena za korelaciju spektralnih podataka (X promenljive) sa nadmorskom visinom uzorkovanja propolisa (Y promenljiva). Primenom ortogonalnog modela sistematske promenljive X se dele na dva dela: linearno povezane sa Y i normalno (ortogonalno) povezane sa Y, čime je umnogome olakšano tumačenje modela. Na osnovu grafika rezultata modela dobijenih od ¹H NMR i p/RES spektara uzorci propolisa prikupljeni na nižim nadmorskim visinama se jasno razlikuju od onih prikupljenim na višim (Slika 15).



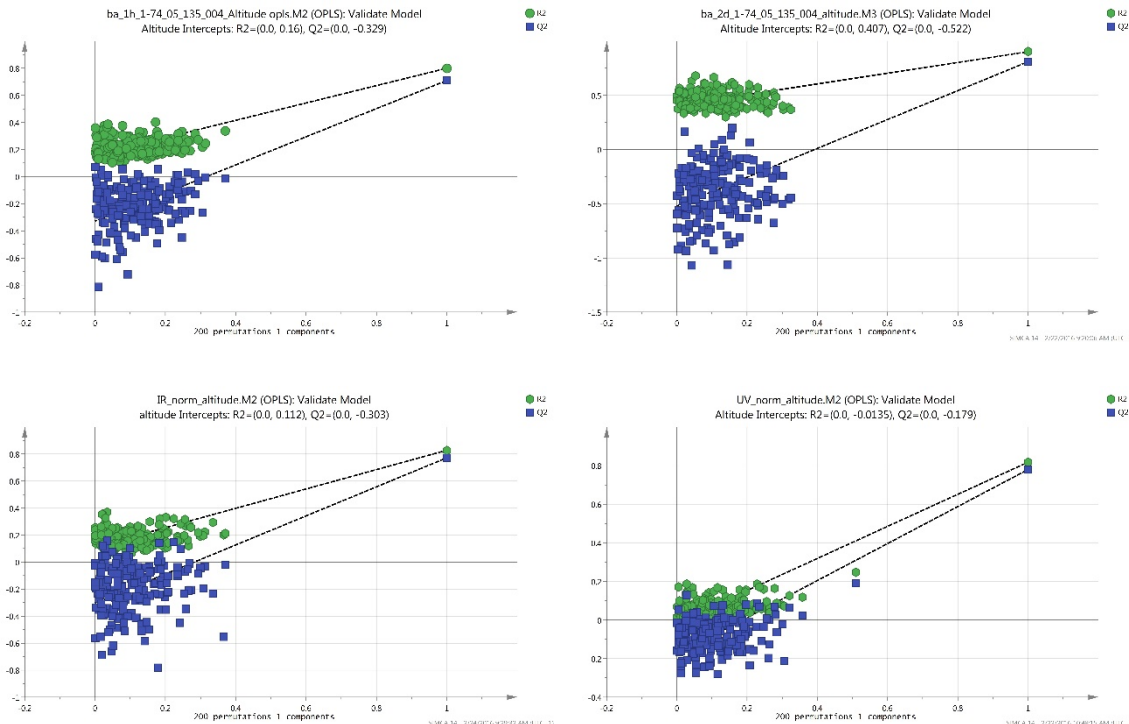
Slika 15. Grafici rezultata OPLS modela dobijenih od ¹H NMR i pJERS spektara uzoraka propolisa. Nadmorske visine lokaliteta sa kojih su uzorci prikupljeni prikazane su odgovarajućim bojama.

OPLS modeli su validirani testom premeštanja (permutacioni test, n = 200) i analizom varijanse nakon unakrsne validacije (CV-ANOVA testom). Valjanost modela je opisana R² faktorom (koeficijent determinacije) koji predstavlja procenat varijacije Y promenljivih koji se može objasniti varijacijom X promenljivih i Q² vrednošću koja predstavlja valjanost predikcione sposobnosti modela (Tabela 9).

Tabela 9. Prikaz osnovnih statističkih parametara OPLS modela

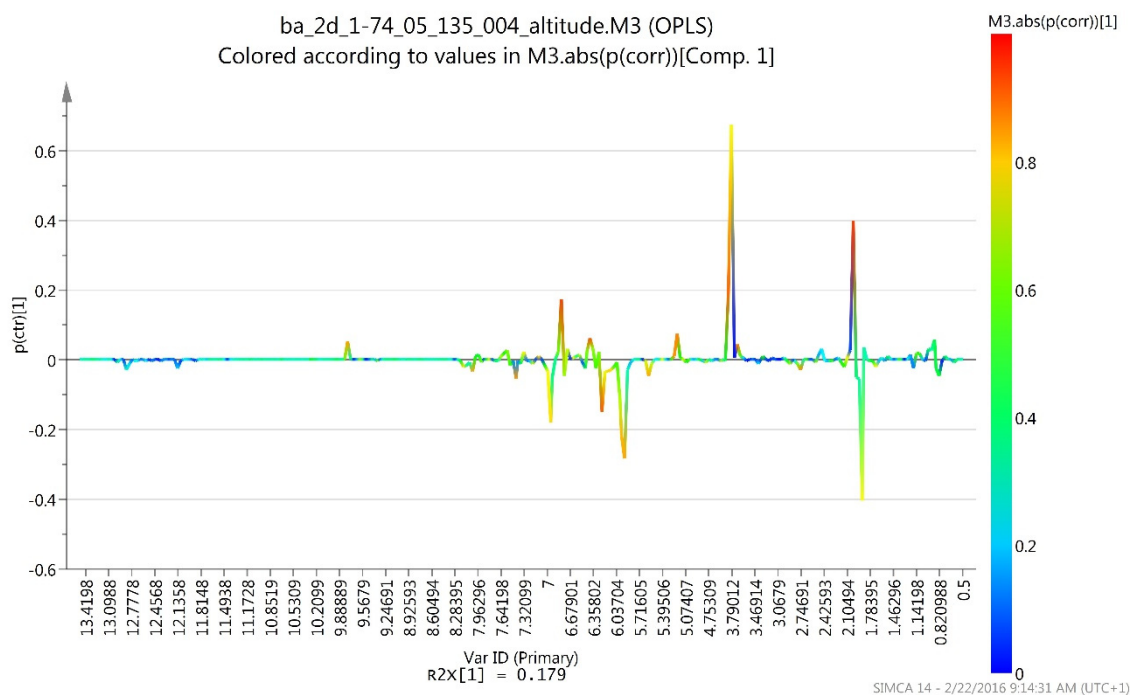
Metoda	Komponente (predviđene + ortogonalne)	R ²	Q ²	p (CV-ANOVA)
¹ H NMR	1 + 1	0,791	0,724	3,02 * 10 ⁻¹⁴
pJRES	1 + 2	0,905	0,811	3,97 * 10 ⁻¹⁷
IR	1 + 1	0,828	0,772	1,01 * 10 ⁻¹⁶
UV	1 + 1	0,817	0,779	8,84 * 10 ⁻¹⁷

Visoke R² i Q² vrednosti potvrđuju da su NMR spektralni podaci metanolnih ekstrakata propolisa zavisni od nadmorske visine uzorkovanja. U slučaju pJRES R² i Q² vrednosti su nešto više nego kod modela dobijenih na osnovu ¹H NMR spektara što je posledica preklapanja signala i širokih signala OH grupa u nivou bazne linije u ¹H NMR spektrima. Prema CV-ANOVA testu oba OPLS modela su podjednako značajna (p < 0,05) što je saglasno sa rezultatima permutacionog testa u kojima regresione linije (Q²) seku vertikalnu osu ispod vrednosti nula, kao i da se sve Q² i R² vrednosti permutovanih Y vektora nalaze znatno niže nego originalne (Slika 16).



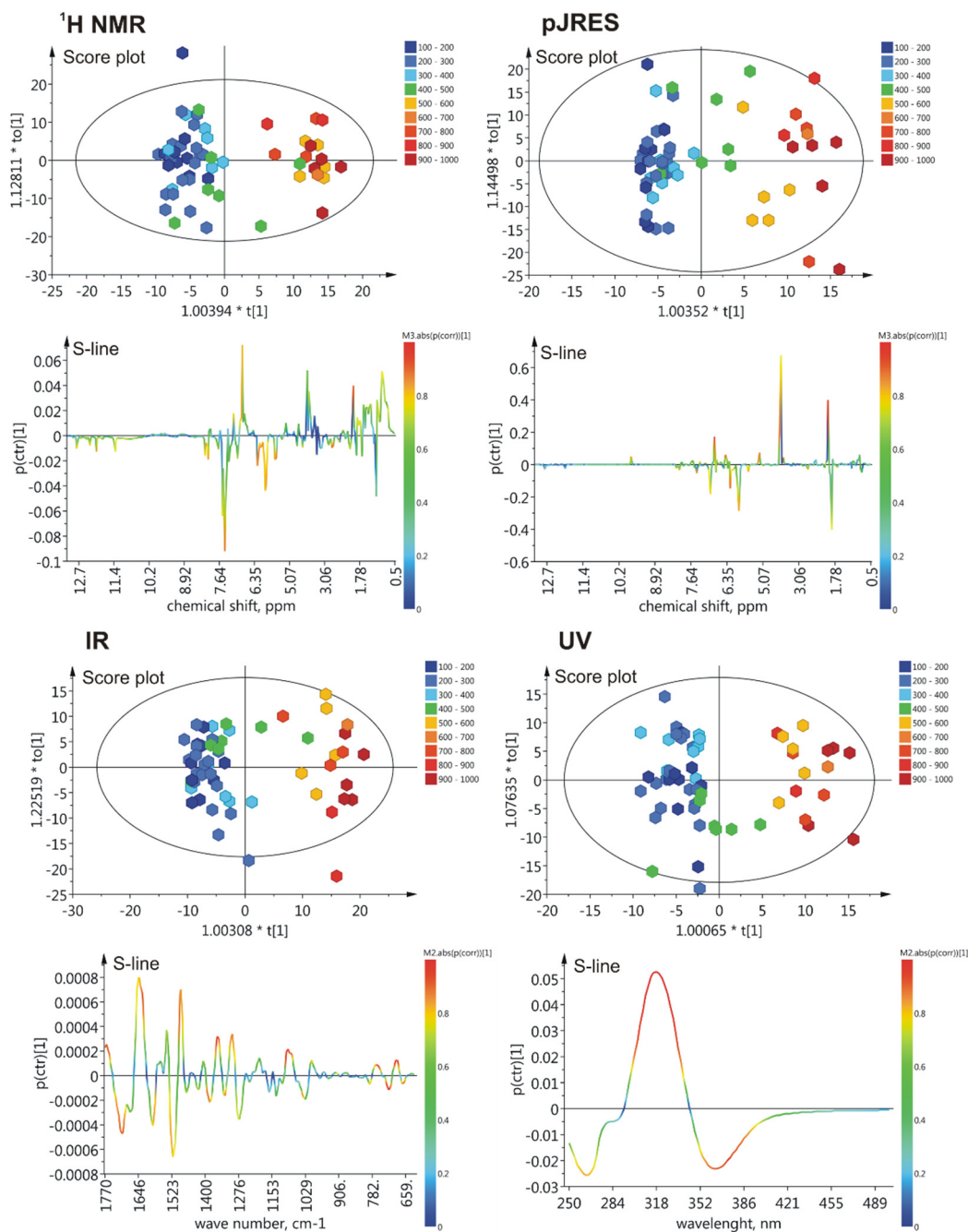
Slika 16. Grafički prikaz rezultata permutacionih testova ^1H , pJRES OPLS modela.

Zbog ranije pobrojanih prednosti pJRES u odnosu na ^1H , pJRES OPLS model je korišćen za određivanje porekla promenljivih karakterističnih za uzorke propolisa prikupljene na različitim nadmorskim visinama. Model je objašnjen preko VIP (eng. Variable influence on projection) skorova predikcionih komponenti (VIP-pred) pri čemu su promenljive sa VIP-pred većim od 1 smatrane značajnim za razdvajanje [113]. Najviše VIP-pred vrednosti imaju promenljive signala koji potiču od hrizina, galangina, pinocembrina, pinobanksin-3-*O*-acetata, 1,3-di-*p*-kumaroil-2-acetil-glicerola, 1,3-di-*p*-feruloil-2-acetil-glicerola, benzil-*p*-kumarata i koniferilbenzoata. Grafik „S-linije”, koji je sličnog oblika kao i originalni spektri, je korišćen za vizuelizaciju doprinosa pojedinačnih promenljivih predikcije (Slika 17).



Slika 17. Grafik S–linije p/RES OPLS modela. Na pozitivnoj strani Y ose su pojednačne promenljive sa najvećim doprinosom uzoraka propolisa prikupljenih iznad 500 m, a suprotno od njih (negativna Y) su pojednačne promenljive sa najvećim doprinosom uzoraka propolisa prikupljenih ispod 400 m nadmorske visine.

Na osnovu analize grafika doprinosa najzastupljenije komponente u metanolnim ekstraktima uzoraka propolisa prikupljenih iznad 500 m nadmorske visine su glicerol estri fenolnih kiselina (1,3-di-*p*-kumaroil-2-acetil-glicerol, 1,3-di-*p*-feruloil-2-acetil-glicerol) i fenilpropanoidi (benzil-*p*-kumarat i koniferilbenzoat) dok su flavonoidi (hrizin, galangin, pinocembrin i pinobanksin-3-*O*-acetat) dominantno prisutni u metanolnim ekstraktima propolisa prikupljenim na nadmorskim visinama nižim od 400 m. U slučaju kada su košnice bile postavljene između 400 i 500 m u propolisu se mogu naći sva pobrojana jedinjenja u različitim odnosima.



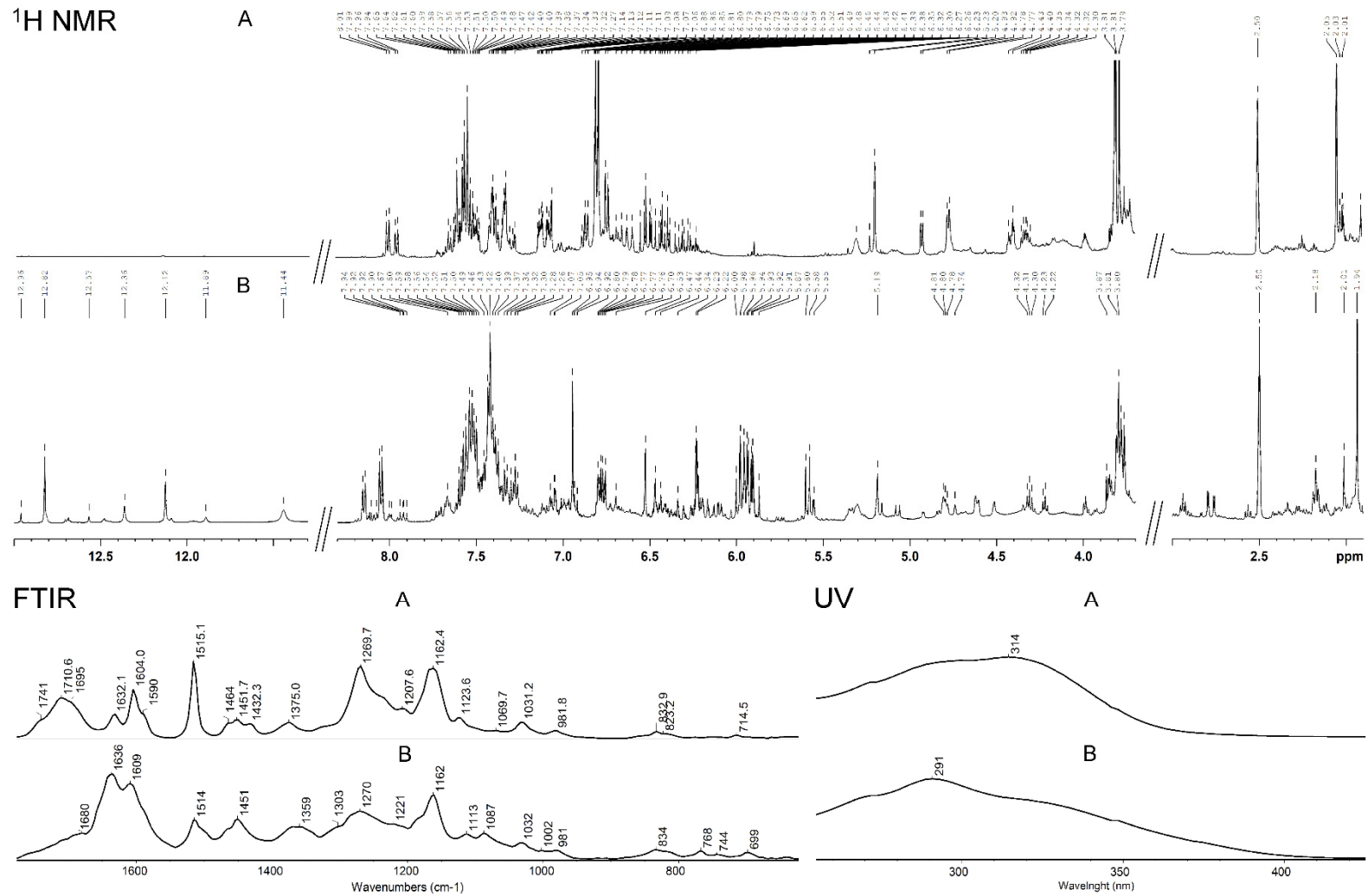
Slika 18. Grafici rezultata i S–linija OPLS modela uzoraka propolisa prikupljenih na različitim nadmorskim visinama dobijeni na osnovi rezultata ¹H NMR, pJRES, IR i UV spektroskopskih tehnika.

Koristeći rezultate IR i UV spektroskopskih merenja, kao i kod NMR modela, dobijeni su OPLS modeli sa visokim R^2 i Q^2 vrednostima (Tabeli 9). Odgovarajući grafički rezultati pokazuju istu zavisnost između hemijskog sastava i nadmorske visine. Grafici S-linija IR i UV zasnovanih OPLS modela daju na uvid signale diskriminišućih komponenti potvrđujući dominantno prisustvo signala poreklom od flavonoida u propolisima prikupljenim na nižim nadmorskim visinama (ispod 400 m) i glicerol

estrara fenolnih kiselina i fenilpropanoida kod uzoraka prikupljenih iznad 500 m nadmorske visine (Slike 17 i 18).

Spektri (^1H NMR, μRES , 2D NMR, IR i UV) reprezentativnih uzoraka propolisa prikazani su na Slici 19, a glavnih komponenti dati su u Prilogu.

Ako bismo poredili spektralne podatke propolisa dobijenih različitim instrumentalnim tehnikama, UV spektroskopija i pored svojih ograničenja u pogledu detaljnijeg opisa glavnih stukturanih komponenti sa uspehom može da detektuje razlike na nivou klasa glavnih komponenti (flavonoide, fenilpropanoide i glicerol estre fenolnih kiselina). Osim toga što se UV spektroskopijom mogu razlikovati propolisi različitog hemijskog sastava to je metoda kojom se lako ovladava, a jeftina je i brza. IR metoda je kao i UV brza i robusna, međutim ako se primenjuje ATR tehnika snimanja nema zahteva za prethodnu pripremu uzoraka. IR spektri sadrže mnogo više informacija nego UV i samim tim su osetljiviji na promene u hemijskom sastavu, ali je asigniranje svake trake u IR spektru, kod tako kompleksnih smeša, gotovo nemoguće. Upotreba odgovarajućih traka kao markera prisustva karakterističnih komponenti u propolisu se time ni na koji način ne ograničava, već naprotiv. NMR spektroskopija bi u ovom slučaju bila najbolji izbor za profilisanje hemijskog sastava metanolnog ekstrakta propolisa primenom 2D tehnika za određivanje strukture glavnih komponenti, ali cena instrumenta i neophodnost primene deuterisanih rastvarača ograničavaju njenu primenu.



Slika 19. ¹H NMR, p/RES, IR i UV spektri reprezentativnih uzoraka propolisa BA5 prikupljenih iznad 500 m (A) i ispod 400 m nadmorske visine.

4.2.2 Određivanje botaničkog porekla propolisa primenom O2PLS modela

S obzirom da postoje jasne razlike u hemijskom sastavu među propolisima prikupljenih na različitim nadmorskim visinama bilo je logično da se objašnjenje ovih razlika potraži u botaničkom poreklu propolisa. Za te svrhe prikupljeni su i analizirani ekstrakti pupoljka topola koje najčešće rastu oko mesta odakle su dobijeni uzorci propolisa. Dominantna vrsta topole koja raste na nadmorskoj visini višoj od 500 m je *P. tremula*, dok se na nižim nadmorskim visinama mogu naći *P. nigra* kao i gajeni hibridi *P. x euramericana*. Za određivanje botaničkog porekla propolisa spektralni podaci ekstrakata pupoljka su analizirani zajedno sa spektralnim podacima ekstrakata propolisa primenom O2PLS modela. Poređenjem dve grupe podataka ovaj model pronalazi zajedničke promenljive između njih, kao i sistemske promenljive specifične za svaki od njih. Za ovu priliku korišćeni su podaci dobijeni ^1H NMR, IR i UV spektroskopijom. 2D J razloženi NMR spektri ekstrakata pupoljaka nisu snimljeni zbog male količine uzorka i potencijalno dugog vremena potrebnog za snimanje. X grupu podataka činili su spektralni podaci ekstrakata propolisa, a Y spektralni podaci ekstrakata pupoljaka topola.

Koristeći ^1H NMR podatke kreiran je O2PLS model sa jednom predikcionom komponentom, osam ortogonalnih u X i sedam ortogonalnih u Y. Prema ovom modelu i $R^2\text{X}$ i $R^2\text{Y}$ parametrima, 42,3% varijacije promenljivih iz ^1H NMR spektralnih podataka ekstrakta propolisa se preklapa (je zajedničko) sa 73,5% varijacije promenljivih prisutnih u ^1H NMR spektrima ekstrakata pupoljaka topola. O2PLS model kreiran na osnovu IR spektralnih podataka imao je dve predikcione komponente, pet ortogonalnih u X i dve ortogonalne u Y. Kod ovog modela 60,6% varijacije promenljivih iz spektralnih podataka ekstrakta propolisa je zajedničko sa 83% varijacije promenljivih koje se nalaze u spektralnim podacima ekstrakata pupoljaka topola. Konačno, O2PLS model baziran na UV podacima imao je jednu predikcionu komponentu, šest ortogonalnih po X i šest ortogonalnih po Y, sa 74,1% varijacije promenljivih prisutnih u spektralnim podacima ekstrakata propolisa koje se preklapaju sa 83,6% varijacije promenljivih u UV spektrima ekstrakata pupoljaka topola (Tabela 10).

Tabela 10. Prikaz osnovnih statističkih parametara O2PLS modela.

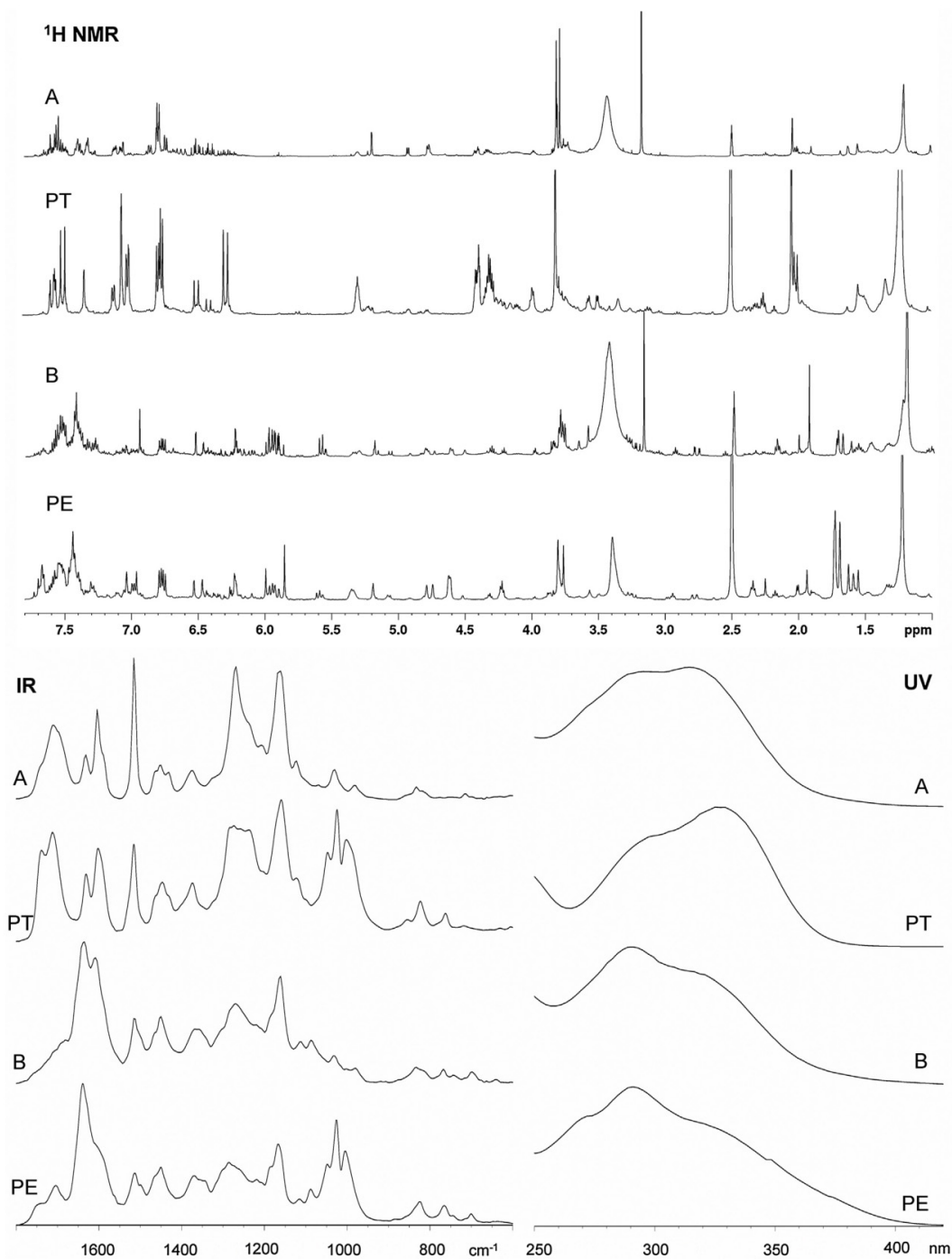
Metoda	Broj komponenti (predikcione + ortogonalne u X + ortogonalne u Y)	R ² X predikcione	R ² X ortogonalne u X	R ² Y predikcione	R ² Y ortogonalne u Y	Q ²
¹ H NMR	1 + 8 + 7	0,423	0,264	0,735	0,261	0,923
IR	2 + 5 + 2	0,606	0,344	0,830	0,140	0,904
UV	1 + 6 + 6	0,741	0,256	0,836	0,163	0,91

Ovako visoki procenti prisutnih zajedničkih promjenljivih između X grupe podataka koji potiču od propolisa i Y grupe, poreklom od ekstrakata pupoljaka u svakom od modela ukazuju na to da je biljno poreklo propolisa prikupljenih iznad 500 m nadmorske visine dominantno od pupoljaka sa *P. tremule*, dok su na nižim nadmorskim visinama glavni izvor propolisa pupoljci sa vrsta *P. nigra* i *P. x euramericana*.

Rezultati VIP-pred veći od jedan u O2PLS modelima služe za identifikovanje uticajnih promjenljivih među zajedničkim promjenljivim. Promenljive koje potiču od flavonoida (hrizina, galangina, pinocembrina, pinobanksin-3-*O*-acetata) i fenolnih glicerida (1,3-di-*p*-kumaroil-2-acetil-glicerola, 1,3-di-*p*-feruloil-2-acetil-glicerola) su važne za određivanje botaničkog porekla. Prema tome pomenuti flavonoidi se mogu smatrati markerima porekla propolisa sa vrsta *P. nigra* i *P. x euramericana* dok fenolni gliceridi mogu biti markeri porekla propolisa sa vrste *P. tremula*.

Spektralni podaci ekstrakata pupoljka sadrže više zajedničkih promjenljivih nego što je to slučaj sa ekstraktima propolisa. Na osnovu VIP rezultata ortogonalne komponente (VIP-ort) u O2PLS NMR modelu, većina ortogonalnih promjenljivih u ekstraktima uzoraka propolisa potiče od zaostalih voskova. Ovo nije ništa neobično s obzirom da pčele prikupljene fenolne smole mešaju sa voskom pri čemu nastaje propolis. Pored toga ne treba isključiti ni prisustvo smola drugih biljnih vrsta osim topola, koje ovom prilikom nisu ispitivane. Tipični ¹H NMR, IR i UV spektri propolisa prikupljenih sa niže i više nadmorske visine kao i odgovarajućih ekstrakata topola su prikazani na Slici 20.

Ovo je prvi put do sada da su korišćene metode multivarijantne analize i spektroskopskih merenja bez prethodnog hromatografskog razdvajanja za povezivanje hemijskog sastava propolisa sa hemijskim sastavom odgovarajućih ekstrakata pupoljaka za potrebe određivanja botaničkog porekla.



Slika 20. ¹H NMR, IR i UV spektri reprezentativnih uzoraka propolisa i pupoljaka topola. A: spektri uzorka propolisa prikupljenog iznad 500 m nadmorske visine; B: spektri uzorka propolisa prikupljenog ispod 400 m nadmorske visine; PT spektri smola pupoljaka vrste *P. tremula*, PE spektri smola pupoljaka vrste *P. x euramericana*.

4.2.3 Klasifikacija prikupljenih uzoraka propolisa

Rezultati PCA i OPLS modela dobijenih od UV, IR, ^1H NMR i pJERS spektara uzoraka propolisa prikupljenih na nadmorskim visinama nižim od 450 m jasno se razlikuju od onih prikupljenim na visinama višim od 500 m te je bilo moguće izvršiti njihovu klasifikaciju (Tabela 10 i Slika. 21) [114]. Za potrebe klasifikacije prikupljenih uzorka podaci NMR (^1H i pJRES), IR i UV spektroskopskih tehnika korišćeni su u kombinaciji sa OPLS-DA metodom (Slika. 21). Dva uzorka prikupljena na nadmorskoj visini od oko 450 m isključena su iz ovih modela jer predstavljaju mešavinu ova dva tipa propolisa.

U sva četiri slučaja dobijeni su OPLS-DA modeli sa R^2 i Q^2 vrednostima bliskim jedinici (Tabela 11). Rezultati validacije modela zadovoljavaju zadate kriterijume permutacionog testa i visokim p vrednostima nakon testa CV-ANOVA metodom (Tabela 11 i Slika 21).

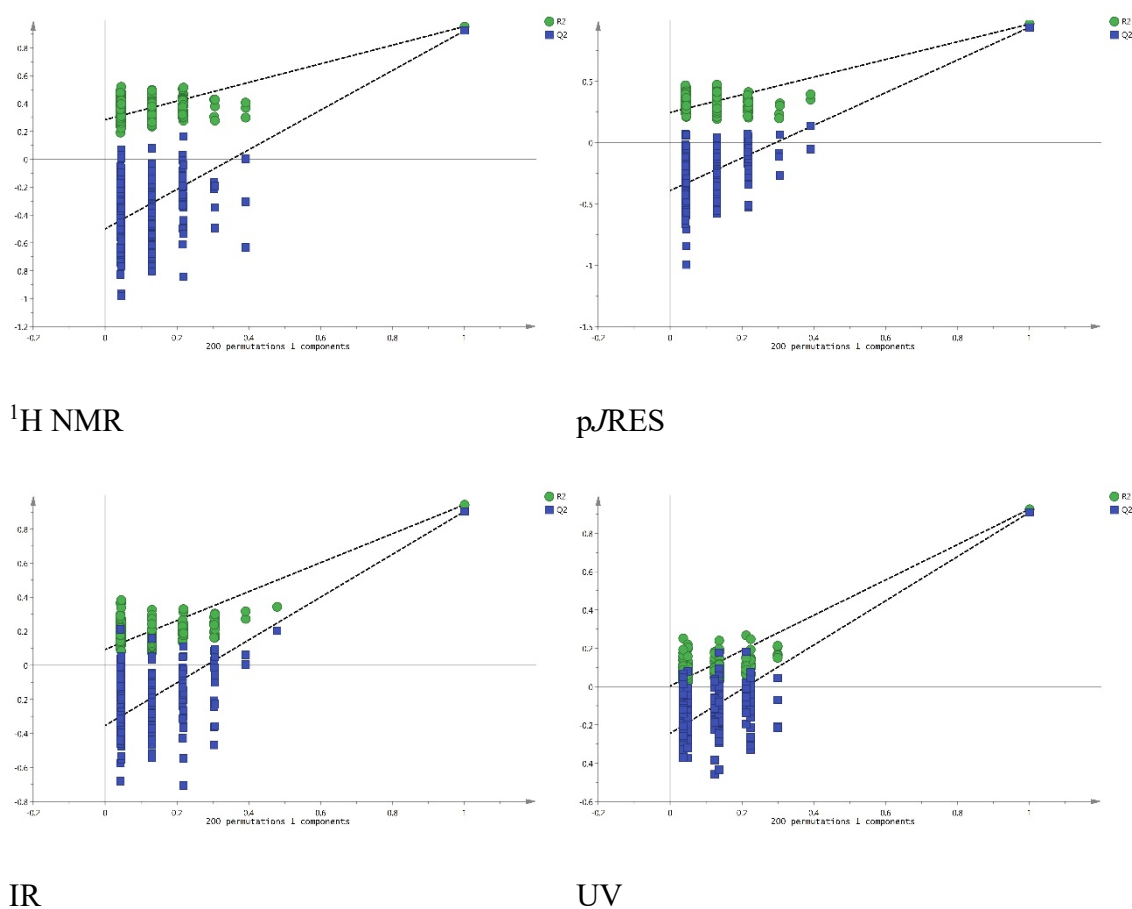
Tabela 11. Prikaz osnovnih statističkih parametara PCA modela (gore) i OPLS-DA modela (dole).

Metoda	Broj glavnih komponenti	R^2 (X)	Q^2
^1H NMR	9	0,873	0,727
pJRES	8	0,781	0,582
IR	16	0,968	0,84
UV	8	0,997	0,993

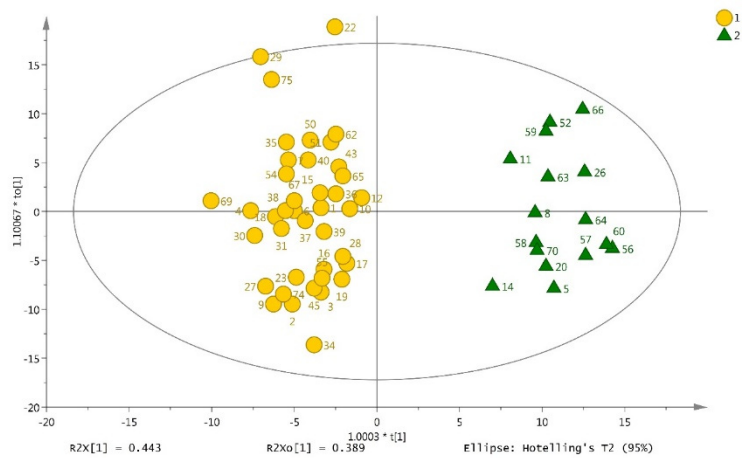
Tabela 12. Prikaz osnovnih statističkih parametara OPLS-DA modela.

Metoda	Broj komponenti (predikcione + ortogonalne)	R^2 (Y)	Q^2	p (CV-ANOVA)
^1H NMR	1 + 2	0,954	0,923	$4,48 * 10^{-26}$
pJRES	1 + 1	0,967	0,94	$4,09 * 10^{-31}$
IR	1 + 1	0,943	0,904	$8,81 * 10^{-26}$
UV	1 + 2	0,926	0,91	$7,30 * 10^{-24}$

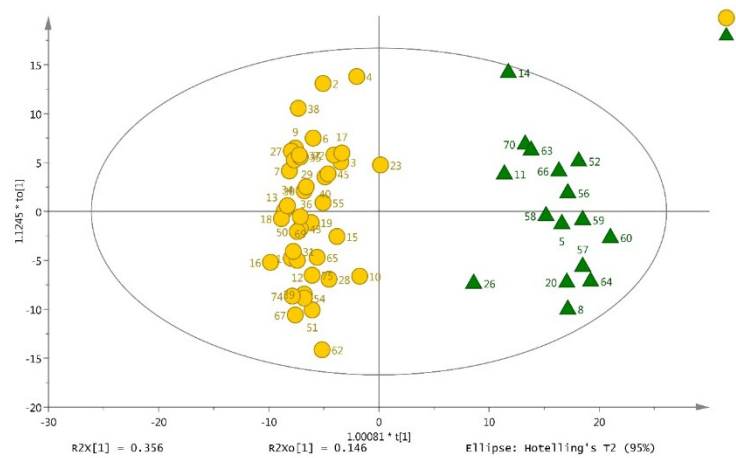
Odgovarajući grafički rezultati pokazuju visok stepen grupisanja uzoraka sličnog hemijskog sastava i pripadnost pripisanoj grupi (Slika 22). S obzirom da je granična vrednost za razlikovanje propolisa po hemijskom sastavu ujedno i granična vrednost za razlikovanje planina od brežuljaka ili ravnice, svi uzorci koji pripadaju klasi 1 (≤ 400 m nadmorske visine) su nazvani ravničarskim, dok uzorci iz klase 2 (≥ 500 m nadmorske visine) pripadaju planiskim propolisima tipa topola.



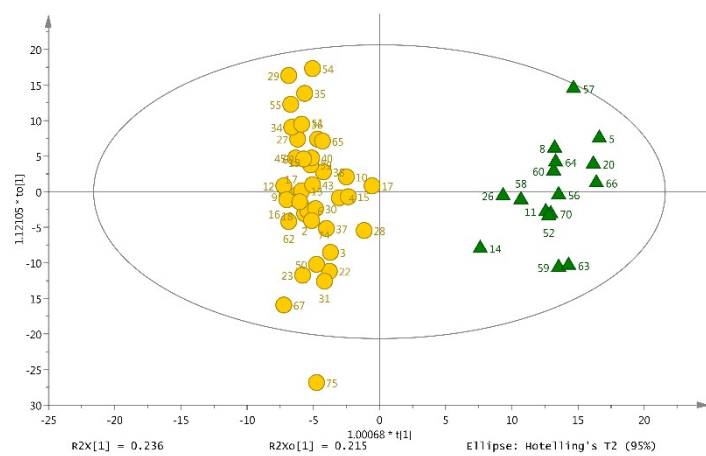
Slika 21. Rezultati permutacionih testova OPLS-DA modela uzoraka propolisa dobijenih na osnovu UV, IR, ^1H i projekcije 2D J razloženih spektralnih podataka.



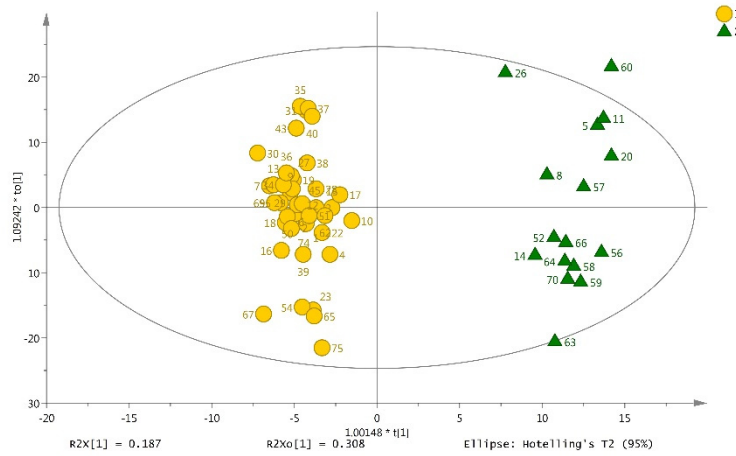
IR



UV



¹H



projekcija 2D *J* razloženi

Slika 22. Grafici rezultata OPLS-DA modela uzoraka propolisa dobijenih na osnovu UV, IR, ¹H i projekcije 2D *J* razloženih spektralnih podataka.

4.3 Antimikrobne aktivnosti

4.3.1 Antibakterijska aktivnost

Antimikrobna aktivnost etanolnih i propilenglikolnih ekstrakata reprezentativnih uzoraka propolisa je testirana na Gram-pozitivnim bakterijama *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), kliničkom izolatu *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus* (ATCC 10240) i *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), kao i na Gram-negativnim bakterijama *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Escherichia coli* (ATCC 35210), i humanom izolatu *Enterobacter cloacae* (Tabela 12). Takođe je testirano dejstvo ekstrakata odabranih uzoraka propolisa (BA 5E, BA 5PG, BA 17E, BA 17PG, BA 31E, BA 31PG, BA 52E, BA 52PG) na formiranje biofilma kod *P.aeruginosa* (Tabela 13).

Tabela 13. Antimikrobna aktivnost etanolnih i propilenglikolnih ekstrakata propolisa (MIC i MBC u mg/ml) .

Oznaka uzorka		<i>S.a.</i>	<i>B.c.</i>	<i>M.f.</i>	<i>L.m.</i>	<i>P.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>En.cl.</i>	<i>S.t.</i>
BA 18 E	MIC	0,125	0,06	0,03	0,125	0,03	0,25	0,25	0,03
	MBC	0,25	0,125	0,06	0,25	0,06	0,50	0,50	0,06
BA 1PG	MIC	0,125	0,25	0,25	0,50	0,50	0,75	0,125	0,25
	MBC	0,25	0,50	0,50	1,0	2,5	1,0	0,25	0,50
BA 17 PG	MIC	0,25	0,25	0,30	0,06	0,03	0,25	0,5	0,125
	MBC	0,50	0,50	0,50	0,125	0,125	0,50	1,0	0,25
BA 18 PG	MIC	0,125	1,25	1,25	2,5	2,5	1,25	1,25	0,50
	MBC	0,25	2,5	2,5	5,0	5,0	2,5	2,5	1,0
BA 1 E	MIC	0,25	0,25	0,3	0,25	0,06	1,25	0,125	0,25
	MBC	0,50	0,50	1,0	0,50	0,125	2,5	0,25	0,50
BA 17 E	MIC	0,03	0,06	0,06	0,25	0,125	0,60	0,7	0,125
	MBC	0,06	0,125	0,125	0,50	0,25	1,25	1,0	0,25
BA 28 E	MIC	0,03	0,03	0,60	0,5	0,06	0,60	0,60	0,05
	MBC	0,06	0,06	1,25	1,0	0,125	1,25	1,25	0,06
BA 28 PG	MIC	0,125	0,25	1,25	0,50	0,25	0,25	0,25	0,25
	MBC	0,25	0,50	2,50	1,0	0,50	0,50	0,50	0,50
BA 8 PG	MIC	0,60	0,60	0,20	1,25	0,25	1,25	0,25	0,60
	MBC	0,25	0,25	0,25	2,5	0,50	2,50	1,25	1,25
BA 8 E	MIC	0,30	0,25	1,25	0,25	0,25	0,30	0,25	0,06
	MBC	0,50	0,50	2,50	1,0	0,50	0,50	2,50	0,125
BA 6 PG	MIC	0,25	0,50	0,50	0,125	0,50	0,125	0,60	0,004
	MBC	0,50	1,0	1,25	1,25	1,0	0,25	1,25	0,008
BA 6 E	MIC	0,50	0,125	0,90	0,90	0,60	0,90	0,90	0,70

Oznaka uzorka		<i>S.a.</i>	<i>B.c.</i>	<i>M.f.</i>	<i>L.m.</i>	<i>P.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>En.cl.</i>	<i>S.t.</i>
BA 45 E	MBC	1,0	0,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,0
	MIC	0,06	0,06	0,06	0,125	0,25	0,125	0,25	0,06
	MBC	0,125	0,125	0,30	0,25	0,50	0,25	0,50	0,125
BA 43 PG	MIC	0,03	0,03	0,03	1,70	0,60	1,70	1,25	0,60
	MBC	0,06	0,06	0,06	2,50	1,25	2,50	2,50	1,25
BA 43 E	MIC	0,125	0,125	0,125	0,60	0,50	0,25	0,25	0,25
	MBC	0,25	0,25	2,50	1,25	1,0	0,50	0,50	0,50
BA 35 E	MIC	0,20	0,20	0,20	0,25	0,06	0,40	0,125	0,20
	MBC	0,25	0,25	0,25	0,50	0,125	0,50	0,25	0,25
BA 35 PG	MIC	0,125	0,20	0,20	0,20	0,20	0,25	0,06	0,125
	MBC	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,50	0,125	0,25
BA 40 PG	MIC	0,125	0,20	0,20	0,25	0,06	0,20	0,125	0,02
	MBC	0,25	0,25	0,25	0,50	0,125	0,25	0,25	0,03
BA 31 E	MIC	0,40	0,20	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,125
	MBC	0,50	0,25	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,25
BA 34 PG	MIC	0,025	0,20	0,20	0,20	0,20	0,125	0,20	0,008
	MBC	0,03	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,016
BA 34 E	MIC	0,20	0,125	0,50	0,25	0,20	0,50	0,20	0,125
	MBC	0,25	0,25	1,0	0,50	0,25	1,0	0,25	0,25
BA 51 E	MIC	0,40	0,40	0,80	0,25	0,80	0,50	0,25	0,40
	MBC	0,50	0,50	1,0	0,50	1,0	1,0	0,50	0,50
BA 52 E	MIC	0,80	0,5	0,50	1,0	0,50	0,5	0,25	0,50
	MBC	1,0	1,0	1,0	6,0	1,0	1,0	0,50	1,0
BA 52 PG	MIC	0,5	1,5	0,30	1,0	0,25	2,0	2,0	1,0
	MBC	1,0	2,0	0,50	6,0	0,50	4,0	4,0	2,0
BA 5E	MIC	0,02	0,3	0,125	0,75	0,2	0,5	0,75	0,125
	MBC	0,03	0,5	0,5	1,0	0,25	1,0	1,0	0,5
BA 5PG	MIC	0,02	0,5	0,25	0,75	0,06	0,06	0,75	0,015
	MBC	0,03	1,0	0,5	1,0	0,125	0,125	1,0	0,03
BA 31PG	MIC	0,004	0,5	0,2	0,5	0,015	0,3	0,25	0,008
	MBC	0,008	1,0	0,25	1,0	0,03	0,5	0,5	0,015
BA 38E	MIC	0,02	0,3	0,2	0,3	0,04	0,3	0,5	0,25
	MBC	0,03	0,5	0,25	0,5	0,06	0,5	1,0	0,5
BA 38PG	MIC	0,004	0,2	0,008	0,25	0,012	0,125	0,25	0,006
	MBC	0,008	0,25	0,015	0,5	0,015	0,5	0,5	0,008
BA 40E	MIC	0,2	0,25	0,3	0,5	0,3	0,3	0,5	0,2
	MBC	0,25	1,0	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,25
BA 45PG	MIC	0,006	0,3	0,25	0,3	0,2	0,2	0,3	0,008
	MBC	0,008	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,15
BA 51 PG	MIC	0,012	0,25	0,3	0,75	0,2	0,3	0,5	0,012
	MBC	0,016	0,5	0,5	1,0	0,25	0,5	1,0	0,016
Streptomycin	MIC	0,1	0,2	0,05	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2
	MBC	0,2	0,3	0,1	0,3	0,3	0,5	0,3	0,3
Ampicillin	MIC	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,4	0,8	0,3
	MBC	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	0,8	1,25	0,5

Tabela 14. Efekat odabranih uzoraka propolisa (BA 5E, BA5 PG, BA 17E, BA 17PG, BA 31E, BA 31PG, BA 52E, BA 52PG) na formiranje biofilma kod *P.aeruginosa* (PAO1).

Šifra uzorka	Formiranje biofilma*		
	0,5MIC	0,25MIC	0,125MIC
BA 5E	94,6 ± 0,5	95,2 ± 3,0	77,2 ± 1,7
BA 5PG	91,2 ± 2,4	91,9 ± 0,9	91,8 ± 3,8
BA 17E	83,6 ± 4,7		
BA 17PG	91,4 ± 1,5	91,6 ± 1,0	89,9 ± 0,6
BA 31E	83,9 ± 0,2	88,3 ± 1,8	42,0 ± 0,5
BA 31PG	88,3 ± 2,2	92,3 ± 4,7	93,5 ± 2,1
BA 52E	82,5 ± 1,5	15,4 ± 0,5	
BA 52PG	77,8 ± 1,3	8,6 ± 0,7	
Ampicilin	14,9 ± 1,1		
Streptomycin	86,8 ± 41,7	36,4 ± 1,9	29,4 ± 0,9

*Vrednost formiranja biofilma je računata kao: (srednja A_{620} tretirani bunarić)/(srednja A_{620} kontrolnog bunarića) × 100. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

4.3.2 Antifungalna aktivnost

DMSO rastvori metanolnih ekstrakata propolisa pripremani za potrebe NMR analize su testirani na antifungalnu aktivnost gljive *Fusarium oxysporum* (Tabela 14).

Tabela 15. Rezultati testiranja procenta inhibicije (I%) rasta gljive *Fusarium oxysporum* tretiranih DMSO rastvorom metanolnih ekstrakata propolisa.

Uzorak	I merenje	II merenje	III merenje	IV merenje	Srednja vrednost	Standardna devijacija
BA 1	19	16	18	19	18	1,4
BA 2	24	18	19	22	20,75	2,8
BA 3	29	25	21	26	25,25	3,3
BA 4	24	28	24	33	27,25	4,3
BA 5	18	22	18	25	20,75	3,4
BA 6	30	28	30	29	29,25	1,0
BA 7	28	26	32	24	27,5	3,4
BA 8	11	19	17	11	14,5	4,1
BA 9	26	29	28	32	28,75	2,5
BA 10	14	28	14	17	18,25	6,7
BA 11	38	38	37	38	37,75	0,5
BA 12	54	43	42	46	46,25	5,4
BA 14	42	33	36	38	37,25	3,8
BA 15	50	38	42	45	43,75	5,1
BA 16	42	45	38	38	40,75	3,4
BA 17	38	38	39	45	40	3,4

Uzorak	I merenje	II merenje	III merenje	IV merenje	Srednja vrednost	Standardna devijacija
BA 18	38	45	45	42	42,5	3,3
BA 19	42	38	40	42	40,5	1,9
BA 20	9	9	17	12	11,75	3,8
BA 22	18	12	19	15	16	3,2
BA 26	24	25	21	25	23,75	1,9
BA 27	18	16	25	18	19,25	3,9
BA 28	16	24	21	19	20	3,4
BA 29	22	26	31	25	26	3,7
BA 30	38	33	38	33	35,5	2,9
BA 34	38				38	
BA 35	29	33	28	32	30,5	2,4
BA 36	31	39	33	38	35,25	3,9
BA 37	31	37	33	37	34,5	3,0
BA 38	46	39	39	40	41	3,4
BA 40	38	39	38	45	40	3,4
BA 43	38	35	36	38	36,75	1,5
BA 45	42	41	41	41	41,25	0,5
BA 50	31	30	33	33	31,75	1,5
BA 51	42	33	33	38	36,5	4,4
BA 52	27	31	28	24	27,5	2,9
BA 54	38	39	35	39	37,75	1,9
BA 55	45	46	49	51	47,75	2,8
BA 56	24	27	33	27	27,75	3,8
BA 57	38	32	24	26	30	6,3
BA 58	21	31	22	31	26,25	5,5
BA 59	19	21	27	16	20,75	4,6
BA 60	51	50	48	48	49,25	1,5
BA 61	39	42	42	40	40,75	1,5
BA 62	24	28	28	31	27,75	2,9
BA 63	27	28	33	38	31,5	5,1
BA 64	26	31	31	30	29,5	2,4
BA 65	46	40	43	39	42	3,2
BA 66	33	31	31	30	31,25	1,3
BA 67	30	31	28	29	29,5	1,3
BA 68	40	38	38	41	39,25	1,5
BA 69	45	46	46	50	46,75	2,2
BA 70	22	16	22	24	21	3,5
BA 71	42	43	45	43	43,25	1,3
BA 72	45	33	42	42	40,5	5,2
BA 73	28	30	33	30	30,25	2,1
BA 74	25	25	30	30	27,5	2,9
BA 75	19	24	30	24	24,25	4,5

Rezultati antifungalne aktivnosti metanolnih ekstrakata fenolnih smola prikupljenih uzoraka nisu se mogli korelisati sa njihovim hemijskim sastavom. Razlog tome može biti

nepreciznost testa, loš izbor model sistema. Još jedan bitan činilac bi mogala biti kompleksnost samih uzoraka. U svakom od njih prisutno je na stotine aktivnih komponenti sa različitim antimikrobnim potencijalom. Na osnovu dobijenih rezultata, detaljna analiza zavisnosti antimikrobne aktivnosti od hemijskog sastava iziskuje opsežniju studiju koja bi po svom obimu sama po sebi mogla biti predmet neke nove disertacije.

5 Zaključak

U literaturi je do sada opisano više različitih tipova propolisa i načina za njihovu klasifikaciju baziranih pre svega na njihovom floralnom i/ili geografskom poreklu. Hemijski sastav uzoraka je analiziran hromatografskim i spektroskopskim tehnikama dostupnim našoj laboratoriji (GC/MS, HPLC/MS, UV, IR i NMR).

Primenom različitih spektroskopskih tehnika u kombinaciji sa naprednim statističkim metodama multivarijantne analize pokazalo se kao moćno oruđe pri korelisanju hemijskog sastava propolisa sa nadmorskom visinom uzorkovanja i botaničkim poreklom. OPLS metoda je korišćena za identifikaciju promena u hemijskom sastavu propolisa, dok je O2PLS metodom određeno njihovo botaničko poteklo. OPLS-DA metoda je korišćena za klasifikaciju prikupljenih uzoraka. Rezultati ovog rada omogućuju, između ostalog, da se samo na osnovu nadmorske visine na kojoj su pčele prikupljale propolis predvide glavne komponente u njemu. Ovo omogućava i pčelarima da ciljano sele košnice na određene lokalitete kako bi dobili propolis odgovarajućeg sastava i kvaliteta, ako za tim ima potrebe.

Poredeći spektroskopske tehnike koje su ovde korišćene, UV je jednostavna, brza i jeftina metoda kojom je moguće razlikovati propolise različitog botaničkog porekla, ali bez mogućnosti detaljne analize prisutnih jedinjenja. IR spektroskopija je takođe jednostavna za korišćenje, brza i jeftina metoda kojom se takođe može odrediti botaničko poreklo propolisa. Ovom metodom se postiže bolji uvid u strukturne karakteristike komponenti propolisa u odnosu na UV spektroskopiju. 1D i 2D NMR spektroskopske tehnike su najkorisnije za određivanje struktura najzastupljenijih jedinjenja u propolisu. Najprikladnija OPLS metoda za opis promenljivih generisana je od JRES NMR signala rotiranih za 45°, koji su zatim simetrizovani i projektovani po F2 frekventnoj osi, jer su na taj način dobijene uprošćene spektralne linije.

Od svih identifikovanih jedinjenja sledećih 8 se pokazalo najznačajnijim za razlikovanje u OPLS JRES modelu: fenolni gliceridi, 1,3-di-*p*-kumaroil-2-acetil-glicerol i 1,3-diferuloil-2-acetil-glicerol; fenilpropanoidni derivati, benzil-*p*-kumarat i koniferil benzoat; kao i flavonoidi, hrizin, galangin, pinocembrin i pinobanksin-3-*O*-acetat.

Na osnovu VIP skorova OPLS, O2PLS i OPLS-DA modela utvrđeno je da su glavne komponente, ujedno i markeri za prepoznavanje, u planinskom propolisu tipa topola fenolni gliceridi poreklom iz pupoljka vrste *P. tremula*. Flavonoidi su glavne komponente i markeri za karakterizaciju i klasifikaciju u ravničarskom propolisu tipa topola, prikupljene sa *P. nigra* i *P. x euramericana*. U propolisima prikupljenim u graničnoj zoni, na nadmorskim visinama od 400 do 500 m prisutna su oba tipa jedinjenja u različitim odnosima, te se oni ne mogu jednoznačno kalsifikovati kao planinski ili ravničarski propolis tipa topola.

6 LITERATURA

1. I. Matoničkin, A. Habdija, B. Primc-Habdija, Beskičmenjaci biologija viših avvertebrata, III prerađeno i dopunjeno izdanje, Školska knjiga Zagreb 1999. str. 445-447.
2. L. B. de Almeida-Muradian, A. H. Matsuda, D. H. Markowicz Bastos, physicochemical parameters of amazon melipona honey, *Quim. Nova*, 30 (2007) 707–708.
3. Harrison, J H (*1 May 1987*). "Roles of individual honeybee workers and drones in colonial thermogenesis" *J. exp. Biol.* 129, 53-61 (1987).
4. <http://www.slideshare.net/instituttam/modul-4-pelarstvo>
5. A. K. Kuropatnicki, E. Szliszka, W. Krol, Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times, *Evid-Based Compl Alt* 11 (2013).
6. V. D. Wagh, Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials, *Advances in Pharm. Sci.* 11 (2013).
7. D. Nicodemo, D. De Jong, R. H. Couto, E. B. Malheiros, Honey bee lines selected for high propolis production also have superior hygienic behavior and increased honey and pollen stores, *Genet Mol Res.* 12 (2013) 6931–6938.
8. <http://teca.fao.org/read/8703>
9. <https://pcela.rs/propolisproduction.htm>
10. S. Huang, C.P. Zhang, K. Wang, G.Q. Li, F.L. Hu, Recent advances in the chemical composition of propolis, *Molecules* 19 (2014) 19610–19632.
11. V.S. Bankova, R.S. Christov, A.D. Tejera, Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands. *Phytochemistry* 49 (1998)1411–1415.
12. V.S. Bankova, S.L. de Castro, M.C. Marcucci, 0. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31 (200) 3–16.
13. V. Bankova, Chemical diversity of propolis and problem of standardization, *J. of ehno-pharmacology* 100 (2005) 114-117.
14. R. S.-Carvalho, F. Baltazar, C. A.-Aguiar, Propolis: A complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development, *Evidence-Based Comp. and Alt. Medicine* (2015) 1–29.

15. M.P. Popova, V.S. Bankova, S. Bogdanov, I. Tsvetkova, C. Naydenski, G.L. Marcuzzan, A.G. Sabatini, Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin, *Apidologie* 38 (2007) 306–311.
16. T. Zhang, R. Omar, W. Siheri, S. Al Mutairi, C. Clements, J. Fearnley, R.A. Edrada-Ebel, D. Watson, Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of African propolis, *Talanta* 120 (2014) 181–190.
17. M.K. Choudhari, S.A. Puneekar, R.V. Ranade, K.M. Paknikar, Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona* sp) propolis used in the folk medicine of Western Maharashtra, India *J. Ethnopharmacol* 141 (2012) 363–367.
18. H.I. Marquez, O. Cuesta-Rubio, F.M. Campo, P.A. Rosado, R.M.O. Porto, A.L. Piccinelli, L. Rastrelli, Studies on the constituents of yellow cuban propolis: GC–MS determination of triterpenoids and flavonoids, *J. Agr. Food Chem.* 58 (2010) 4725–4730.
19. V.A. Isidorov, L. Szczepaniak, S. Bakier, GC-MS Rapid determination of botanical precursors of Eurasian propolis, *Food Chem.* 142 (2014) 101–106.
20. M. Popova, B. Trusheva, S. Cutajar, D. Antonova, D. Mifsud, C. Farrugia, V. Bankova, Identification of the plant origin of the botanical biomarkers of Mediterranean type propolis, *Nat. Prod. Commun.* 7 (2012) 569–570.
21. M. Popova, E. Giannopoulou, K. Skalicka-Woźniak, OrCID, K. Graikou, J. Widelski, V. Bankova, H. Kalofonos, G. Sivolapenko, K. Gaweł-Bęben, B. Antosiewicz, I. Chinou, Characterization and Biological Evaluation of Propolis from Poland, *Molecules* 22 (2017), doi:10.3390/molecules22071159.
22. T. Zhang, R. Omar, W. Siheri, S. Al Mutairi, C. Clements, J. Fearnley, R.A. Edrada-Ebel, D. Watson, Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of African propolis, *Talanta* 120 (2014) 181–190.
23. F.M. Campo, O. Cuesta-Rubio, P.A. Rosado, R.M. De Oca Porto Marquez, I. Hernandez, A.L. Piccinelli, L. Rastrelli, GC–MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples, *J. Agr. Food Chem.* 56 (2008) 9927–9932.
24. M.P. Popova, K. Graikou, I. Chinou, V.S. Bankova, GC–MS profiling of diterpene compounds in mediterranean propolis from Greece, *J. Agr. Food Chem.* 58 (2010) 3167–3176.
25. M. Kartal, S. Kaya, S. Kurucu, GC–MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey, *Z. Naturforsch. C* 57 (2002) 905–909.

26. M.L. Khalil, Biological activity of bee propolis in health and disease, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 7 (2006) 22–31.
27. Bob B. Buchanan, Wilhelm Gruissem, Russell L. Jones, *Biochemistry & molecular biology of plants*; American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland 2000.
28. V.D. Wagh, Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials, *Advances in Pharmacological Sciences* 2013 (2013) 11.
29. C. Brunetti, M. Di Ferdinando, A. Fini, S. Pollastri, M. Tattini, Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 3540–3555.
30. S. Kumazawa, T. Hamasaka, T. Nakayama, Antioxidant activity of propolis of various geographic origins, *Food Chemistry* 84 (2004) 329–339.
31. A. Kurek-Górecka, A. Rzepecka-Stojko, M. Górecki, J. Stojko, M. Sosada G. Świerczek-Zięba, Structure and Antioxidant Activity of Polyphenols Derived from Propolis, *Molecules* 19 (2014) 78-101.
32. N. Sánchez, S. Miranda, P. Vit, A. J. Rodríguez-Malaver¹, Propolis protects against oxidative stress in human saliva, *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 2 (2): 72 - 76 (2010).
33. G. Agati, E. Azzarello, S. Pollastri, M. Tattini, Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance, *Plant Science* 196 (2012) 67–76.
34. S. P. Kazazić, antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida, *Arh Hig Rada Toksikol* 55 (2004) 279–290.
35. A. D. P. Alexiou, C. C. Decandio, S. da N. Almeida, M. J. P. Ferreira, P. Romoff, R. C. Rocha, Trinuclear Oxo-Chromium(III) Complex Containing the Natural Flavonoid Primuletin: Synthesis, Characterization, and Antiradical Properties, *Molecules* 20 (2015) 6310–6318.
36. M. M. Kasprzak, A. Erxlebenb, J. Ochockia, Properties and applications of flavonoid metal complexes, *RSC Adv.*, 5 (2015) 45853.
37. C.-R. Osmany, A. F.-U. Bernardo, R.-A. Teresa, C. Jorge, Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosone, *Journal of Biosciences* 57 (2002) 372–378.
38. K. Durdane, S. Guldeniz, S. Kadriye, S. Bekir, Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats, *Food Chem* 78 (2002) 213–217.

39. S. K. Basso, C. B. Jose, C. E. de Oliveira, G. M. de Assis, S. J. Mauricio, Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of a propolis-containing mouthwash on human monocytes, *Pathog Dis* 74 (2016).
40. M. Franchin, J. G. Lazarini, B. D. Nani, M. G. da Cunha, I. A. Freires, D. F. Colon S. M. de Alencar, P. L. Rosalen, The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs, *Eur J Med Chem* (2017).
41. F.-T., Megumi, O. Kazuhi, I. Rika, T. Kenji, Y. Ken, N. Yuji, K. Fumiyuki, K. Tadashi, T. Hiroomi, Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway, *Int. Immunopharmacology* 25 (2015) 189–198.
42. W. Zhou, Z. Aiqin, T. Fumiko, O. Ryo, L. Yicong, H. Yuka, W. Shizheng, N. Hiroshi, Brazilian green propolis suppresses the hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF- κ B activation in microglia, *Oxid Med Cell Longev* 2013 (2013) 906726.
43. S. M. A. Estabelle, J. P. Nathan Chai, Y. Lee, Q. Ming, S. C. Tak, H. S., James. J. A. David, H. Z. Ming, X. Jiake, Caffeic acid phenethyl ester, an active component of honeybee propolis attenuates osteoclastogenesis and bone resorption via the suppression of RANKL-induced NF- κ B and NFAT activity, *Am J Physiol-Lung C* 221 (2009) 642–649.
44. J. M. Murad, S. A. Calvi, A. M. V. C. Soares, V. Bankova, J. M. Sforcin, Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*, *J Ethnopharmacol* 79 (2002) 331–334.
45. F. Missima, A. A. F. da Silva, G. A. Nunes, C. P. B. Paula, J. P. B. de Sousa, B. K. Jairo, S. M. Jose, Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation, *J Pharm Pharmacol* 59 (2007) 463–468.
46. M. Yuan, Z. Jia-Xiang, L. Ya-Nan, G. Ai, G. Hao, Z. Wang-Jian, Z. Xiao-Ning, H. Mao, Caffeic acid phenethyl ester alleviates asthma by regulating the airway microenvironment via the ROS-responsive MAPK/Akt pathway, *Free Radical Biology & Medicine* 101 (2016) 163–175.
47. D. Kenichiro, F. Masaki, S. Yui, O. Mariko, G. Min, T. Masanori, K. Kenji, K. Anna, W. Hideki, Chemopreventive Action by Ethanol-extracted Brazilian Green Propolis on Post-initiation Phase of Inflammation-associated Rat Colon Tumorigenesis, *In vivo* 31 (2017), 187–197.

48. A. Yildirim, G. G. Duran, N. Duran, K. Jenedi, B. S. Bolgul, M. Miraloglu, M. Muz
Antiviral activity of hatay propolis against replication of herpes simplex virus type 1
and type 2, *Medical science monitor : international medical journal of experimental
and clinical research* 22 (2016) 422–430.
49. M. Amoros, C.M.O. Simões, L. Girre, F. Sauvager, M. Cormier, Synergistic effect of
flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture.
Comparison with the antiviral activity of propolis. *J. Nat. Prod.* 55 (1992)1732–1740.
50. G. Gekker, S. Hu, M. Spivak, J. R. Lokensgard, P. K. Peterson, Anti-HIV-1 activity
of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures, *J Ethnopharmacol* 102
(2005) 158–163.
51. P. Schnitzler, A. Neuner, S. Nolkemper, C. Zundel, H. Nowack, K. H. Sensch, J.
Reichling, Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected
compounds, *Phytother Res* 24 (2010)20–28.
52. S. Tait, A. L. Salvati, N. Desideri, L. Fiore, Antiviral activity of substituted
homoisoflavonoids on enteroviruses. *Antivir Res* 72 (2006) 252–255.
53. N. Kumar, M. K. K. Ahmad, R. Dang, and A. Husain, “Antioxidant and antimicrobial
activity of propolis from Tamil Nadu zone,” *J Med Plants Res*, 2 (2008) 361–364.
54. O. K. Mirzoeva, R. N. Grishanin, P. C. Calder, Antimicrobial action of propolis and
some of its components. The effects on growth, membrane potential, and motility of
bacteria, *Microbiol Res* 152 (1997) 239–246.
55. C. Kunqiang, L. Weiqiang, Z. Lili, S. Xu, H. Jin, Caffeic acid phenethyl ester
(CAPE), an active component of propolis, inhibits *Helicobacter pylori* peptide
deformylase activity, *Biochem Bioph Res Co* 435 (2013) 289–294.
56. F. Scazzocchio, F. D. D'Auria, D. Alessandrini, F. Pantanella, Multifactorial aspects
of antimicrobial activity of propolis, *Microbiol Res* 161 (2006) 327–333.
57. R. O. Orsi, A. Fernandes, V. Bankova, J. M. Sforcin, Antibacterial effects of
Brazilian and Bulgarian propolis and synergistic effects with antibiotics acting on the
bacterial DNA and folic acid, *Natural Product Research* 26 (2012) 344–349.
58. L. Grenho, J. Barros, C. Ferreira, V. R. Santos, F. J. Monteiro, M. P. Ferraz, M. E.
Cortes, *In vitro* antimicrobial activity and biocompatibility of propolis containing
nanohydroxyapatite, *Biomed Mater.* 10 (2015) 025004.
59. S. I. Falcao, N. Vale, P. Cos, P. Gomes, C. Freire, L. Maes, M. Vilas-Boas, *In vitro*
evaluation of Portuguese propolis and floral sources for antiprotozoal, antibacterial
and antifungal activity, *Phytother Res: PTR* 28 (2014) 437–443.

60. P. Szweda, K. Gucwa, E. Kurzyk, E. Romanowska, K. Dzierzanowska-Fangrat, A. Zielinska Jurek, P. M. Kus, S. Milewski, Essential oils, silver nanoparticles and propolis as alternative agents against fluconazole resistant *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei* clinical isolates, *Indian J Microbiol* 55 (2015) 175–183.
61. B. Pippi, A. J. D. Lana, R. C. Moraes, C. M. Gueez, M. Machado, L. F. S. de Oliveira, G. Lino von Poser, A. M. Fuentefria, *In vitro* evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp., *J Appl Microbiol* 118 (2015) 839–850.
62. J. S. Rhim, Neoplastic transformation of human cells *in vitro*, *Crit Rev Oncog*. 4 (1993) 313–335.
63. M. A. E. Watanabe, M. K. Amarante, B. J. Conti, J. M. Sforcin, Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review, *J Pharm Pharmacol* 63 (2011) 1378–1386.
64. R. Kubina, A. Kabala-Dzik, B. Bielec, M. Wyszynska, B. Stawiarska-Pieta, E. Szaflarska-Stojko, A. Dziedzic, R. D. Wojtyczka, R. J. Buldak, The ethanol extract of Polish propolis exhibits anti-proliferative and/or pro-apoptotic effect on HCT 116 colon cancer and Me45 malignant melanoma cells *in vitro* conditions, *Advances in clinical and experimental medicine* 24 (2015), 203–212.
65. H. Li, A. Kapur, J. X. Yang, S. Srivastava, D. G. McLeod, J. F. Paredes-Guzman, A. Dausch, Y. K. Park, J. S. Rhim, Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. *Int. J. Oncol.*, 31 (2007) 601–606.
66. R. Silva-Carvalho, F. Baltazar, C. Almeida-Aguiar, Propolis: A complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development, evidence-based, *Complem Altern M* 2015 (2015), Article ID 206439.
67. G. M. Sulaiman, A. H. Ad'hiah, K. W. Al-Sammarae, Assessing the anti-tumour properties of Iraqi propolis *in vitro* and *in vivo*, *Food Chem Toxicol*, 50 (2012) 1632–1641.
68. K. McEleny, R. Coffey, C. Morrissey, J. M. Fitzpatrick, R. W. G. Watson, Caffeic acid phenethyl ester-induced PC-3 cell apoptosis is caspase-dependent and mediated through the loss of inhibitors of apoptosis proteins, *BJU Int*, 94 (2004) 402–406.
69. V. Cavaliere, D. L. Papademetrio, T. Lombardo, S. N. Costantino, G. A. Blanco, E. M. C. Álvarez, Caffeic acid phenylethyl ester and MG132, two novel

- nonconventional chemotherapeutic agents, induce apoptosis of human leukemic cells by disrupting mitochondrial function, *Targeted Oncology*, 9 (2014) 25–42.
70. M.-R. Ahn, K. Kunimasa, T. Ohta, Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation, *Cancer Lett* 252, (2007) 235–243.
 71. T. Ohta, K. Kunimasa, M.-R. Ahn, Brazilian propolis suppresses angiogenesis by inducing apoptosis in tube-forming endothelial cells through inactivation of survival signal ERK1/2, *Evid-Based Compl Alt*, vol. 2011 (2011) Article ID 870753.
 72. H. Izuta, M. Shimazawa, K. Tsuruma, Y. Araki, S. Mishima, H. Hara, Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells, *BMC Complem Altern M*, 9 (2009) 45.
 73. O. Fiehn, Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.*, 48 (2002), 155-171.
 74. V. Shulaev, Metabolomics technology and bioinformatics, *Briefings Bioinf.*, 7 (2006), 128-139.
 75. J.-L. Vincent (ed.), *Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine 2012*.
 76. Nicholson, J. K., Lindon, J. C. and Holmes, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data., *Xenobiotica*, 29 (1999) 1181–1189.
 77. D. G. Robertson, Metabonomics in toxicology: a review. *Toxicol. Sci.*, 85 (2005) 809–822
 78. H.K. Kim, Y.H. Choi, R. Verpoorte, NMR-based metabolomic analysis of plants, *Nat. Protoc.* 5 (2010) 536–549.
 79. L. Eriksson, T. Byrne, E. Johansson, J. Trygg, C. Wikström, *Multi- and Megavariate Data Analysis Basic Principles and Applications*, 3rd. revised ed., *Umetrics Academy*, 2013, 2016, pp. 220–223.
 80. Eriksson, S. Wold, J. Tryg, O2PLS® for improved analysis and visualization of complex data, <http://www.sigmaplus.fr/telecharg/SimcaP/O2PLS.pdf>
 81. <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore>
 82. Federica Pellati, Giulia Orlandini a, Diego Pinetti b, Stefania Benvenuti, *Jurnal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55(2011) 934–948.

83. M. Popova, B. Trusheva, R. Khismatullin, N. Gavrilova, G. Legotkina, J. Lyapunov, V. Bankova, The triple botanical origin of Russian propolis from the Perm region: its phenolic content and antimicrobial activity, *Nat. Prod. Commun.* 8 (2013) 617–620.
84. M. Popova, B. Trusheva, D. Antonova, S. Cutajar, D. Mifsud, C. Farrugia, I. Tsvetkova, H. Najdenski, V. Bankova, The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta, *Food Chem* 126 (2011) 1431–1435.
85. B. Trusheva, M.a Popova, E. B. Koendhori, I. Tsvetkova, C. Naydenski, V. Bankova, Indonesian propolis: chemical composition, biological activity and botanical origin, *Natural Product Research* 25, (2011).
86. B. S. Bruno, L.R. Pedro, A. C. Jaime, I. Masaharu, C. S. Vinícius, E. Alessandro, M. A. Severino, Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis, evid based complement, *Alternat Med.* 5 (2008) 313–316.
87. C. Sârbu, A.C. Mot, Ecosystem discrimination and fingerprinting of Romanian propolis by hierarchical fuzzy clustering and image analysis of TLC patterns, *Talanta* 85 (2011) 1112–1117.
88. D. Milojković Opsenica, P. Ristivojević, J. Trifković, I. Vovk, D. Lušić, Ž. Tešić, TLC fingerprinting and pattern recognition methods in the assessment of authenticity of poplar-type propolis, *J. Chromatogr. Sci.* 54 (2016) 1077–1083.
89. P. Ristivojević, F.L. Andrić, J. Đ. Trifković, I. Vovk, L. Ž. Stanisavljević, L. Ž. Tešić, D. Milojković Opsenica, Pattern recognition methods and multivariate image analysis in HPTLC fingerprinting of propolis extracts, *J. Chemom.* 28 (2014) 301–310.
90. G. E. Morlock, P. Ristivojević, E. S. Chernetsova, Combined multivariate data analysis of high-performance thin-layer chromatography fingerprints and direct analysis in real time mass spectra for profiling of natural products like propolis, *J. Chromatogr. A* 1328 (2014) 104–112.
91. I. Dimkić, P. Ristivojević, T. Janakiev, T. Berć, J. Trifković, D. Milojković-Opsenica, S. Stanković, Phenolic profiles and antimicrobial activity of various plant resins as potential botanical sources of Serbian propolis, *Ind. Crops Prod.* 94 (2016) 856–871.
92. A. C. H. F. Sawaya, C. I. B. da Silva, M. C. Marcucci, Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis, *Chemistry Central Journal* 5 (2011) 27.
93. D.G. Watson, E. Peyfoon, L. Zheng, D. Lu, V. Seidel, B. Johnston, J.A. Parkinson, J. earnley, Application of principal components analysis to ¹H NMR data obtained from

- propolis samples of different geographical origin, *Phytochem. Anal.* 17 (2006) 323–331.
94. G. Papotti, D. Bertelli, M. Plessi, M.C. Rossi, Use of HR-NMR to classify propolis obtained using different harvesting methods, *Int. J. Food Sci. Tech.* 45 (2010) 1610–1618.
 95. D. Bertelli, G. Papotti, L. Bortolotti, G.L. Marcazzan, M. Plessi, ¹H NMR simultaneous identification of health-relevant compounds in propolis extracts, *Phytochem. Anal.* 23 (2012) 260–266.
 96. N. D. Yuliana, C. H. Wijaya, N. Nasrullah, Classification of *Trigona* spp bee propolis from four regions in Indonesia using FTIR metabolomics approach, 13th ASEAN Food Conference 9-11 September 2013. Singapore.
 97. R. Cai, S. Wang, Y. Meng, Q. Meng, W. Zhao, Rapid quantification of flavonoids in propolis and previous study for classification of propolis from different origins by using near infrared spectroscopy, *Anal. Methods-UK* 4 (2012) 2388–2395.
 98. M. Maraschin, A. Somensi-Zeggio, S.K. Oliveira, S. Kuhnen, M.M. Tomazzoli, J.C. Raguzzoni, C.M. Zeri Ana, R. Carreira, S. Correia, C. Costa, M. Rocha, Metabolic profiling and classification of propolis samples from southern Brazil: an NMR-Based platform coupled with machine learning, *J. Nat. Prod.* 79 (2016) 13–23.
 99. C. Gardana, M. Scaglianti, P. Pietta, P. Simonetti, Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Pharmaceut. Biomed.* 45 (2007) 390–399.
 100. K. Midorikawa, A.H. Banskota, Y. Tezuka, T. Nagaoka, K. Matsushige, D. Message, A.A.G. Huertas, S. Kadota, Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis, *Phytochem. Anal.* 12 (2001) 366–373
 101. O. Cuesta-Rubio, A.L. Piccinelli, M.C. Fernandez, I.M. Hernández, A. Rosado, L. Rastrelli, Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown red, and yellow Cuban varieties of propolis, *J. Agric. Food. Chem.* 55 (2007) 7502–7509.
 102. L. Chunying, Z. Xiaoli, L. Yuanqian, S. Chengjun, J. Yan, W. Zhiyun, Determination of flavonoids in propolis-rich functional foods by reversed phase high performance liquid chromatography with diode array detection, *Food Chem.* 127 (2011) 314–320.
 103. J. Bertrams, N. Kunz, M. Müller, D. Kammerer, F.C. Stintzing, Phenolic compounds as marker compounds for botanical origin determination of German propolis samples based on TLC and TLC-MS, *J. Appl. Bot. Food Qual.* 86 (2013) 143–153.

104. S.I. Falcao, N. Vale, P. Gomes, M.R.M. Domingues, C. Freire, S.M. Cardoso, M. Vilas-Boas, Phenolic profiling of portuguese propolis by LC-MS spectrometry: uncommon propolis rich in flavonoid glycosides, *Phytochem. Anal.* 24 (2013) 309–318.
105. V. A. Isidorov, S. Bakier, E. Pirożnikow, M. Zambrzycka, I. Swiecicka, Selective behaviour of honeybees in acquiring European propolis plant precursors, *J Chem Ecol* 42 (2016) 475–485.
106. V.A. Isidorov, M. Brzozowska, U. Czyzewska, L. Glinka, Gas chromatographic investigation of phenylpropenoid glycerides from aspen (*Populus tremula* L.) buds, *J Chromatogr A*, 196–201 (2008) 1198–1199.
107. H. Shi, H. Yang, X. Zhang, Y. Sheng, H. Huang, L. Yu, Isolation and characterization of five glycerol esters from wuhan propolis and their potential anti-inflammatory properties, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 10041-10047.
108. G. Negria, M. C. Marcuccia, A. Salatinob, M. L. F. Salatino, Comb and propolis waxes from brazil (States of São Paulo and Paraná), *J Braz Chem Soc* 11 (2000) 453–457.
109. C.N.R. Rao, Chemical application of infrared spectroscopy, Academic press, New York and London, 1963, pp. 175–237.
110. R. Swisłocka, M. Kowczyk-Sadowy, M.W.L. Kalinowska, Spectroscopic (FT-IR FT-Raman, ¹H and ¹³C NMR) and theoretical studies of *p*-coumaric acid and alkali metal *p*-coumarates, *Spectroscopy-US* 27 (2012) 35–48.
111. M. Heneczowski, M. Kopacz, D. Nowak, A. Kuzniar, Infrared spectrum of some flavonoids, *Acta Pol Pharm* 58 (2001) 415–420.
112. L. Christian, R.V. Mark, Two-dimensional *J*-resolved NMR spectroscopy: review of a key methodology in the metabolomics toolbox, *Phytochem Anal* 21 (2010) 22–32.
113. B. Galindo-Prieto, L. Eriksson, J. Trygg, Variable influence on projection (VIP) for orthogonal projections to latent structures (OPLS), *J Chemometr* 28 (2014) 623–632.
114. B. Worley, R. Powers, PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability, *Curr Metabolomics*. 2016 ; 4(2): 97–103.

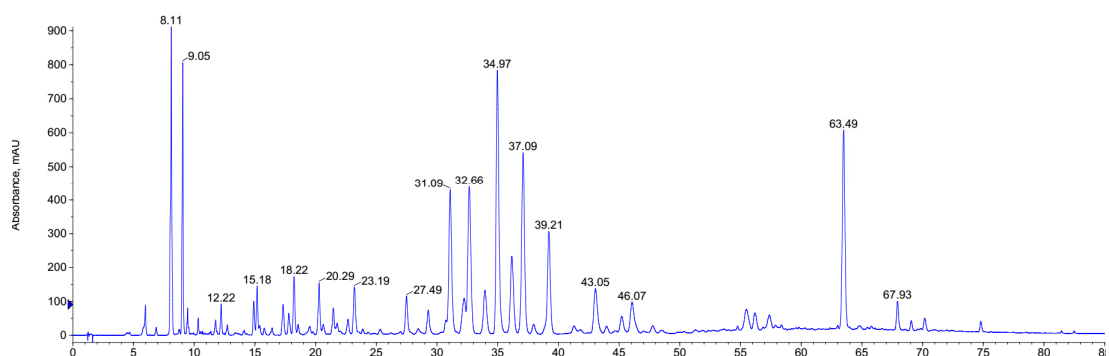
7 PRILOZI



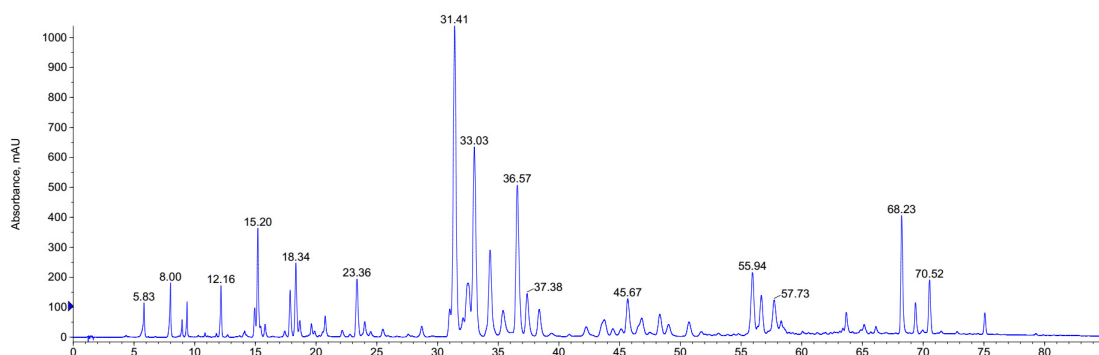
Preuzeto sa sajta: www.dreamstime.com/stock-photos-illustration-funny-bee-cartoon-waving-image29714773

Prilog 1. HPLC hromatogrami uzoraka planinskog (BA 5) i ravničarskog (BA 18) propolisa kao i Fenolnih smola pupoljaka *Populus thremula* (BAPT) i *P. x euramericana* (BAEA).

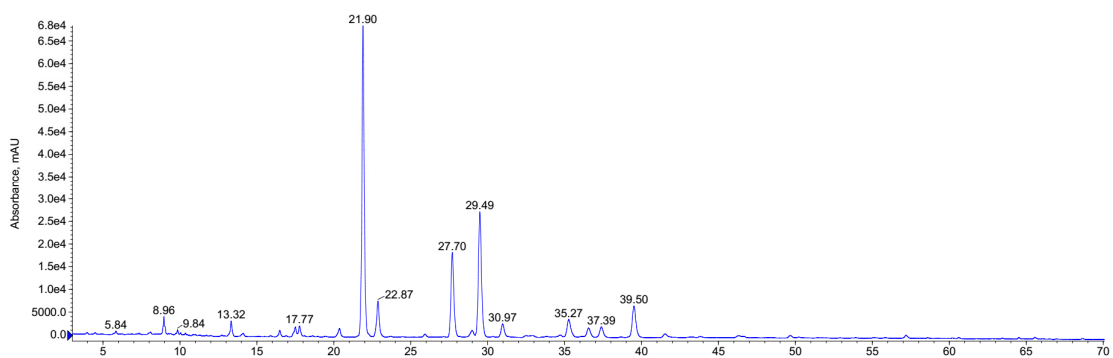
BA 5



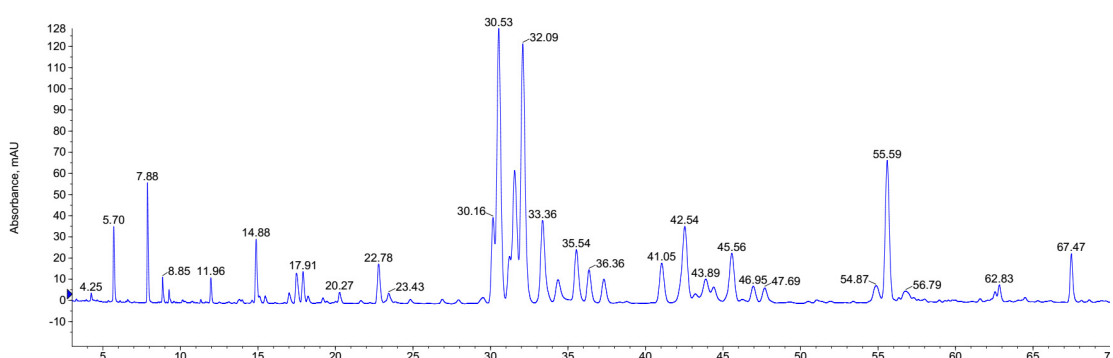
BA 8



BAPT

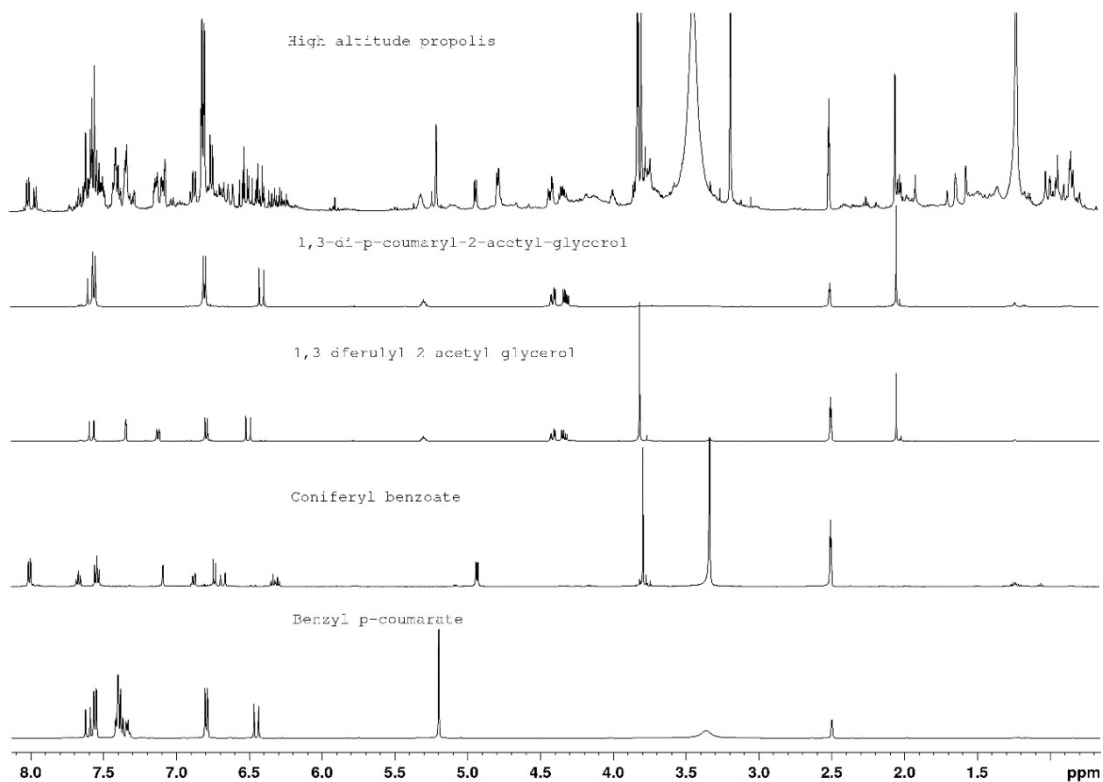


BAEA

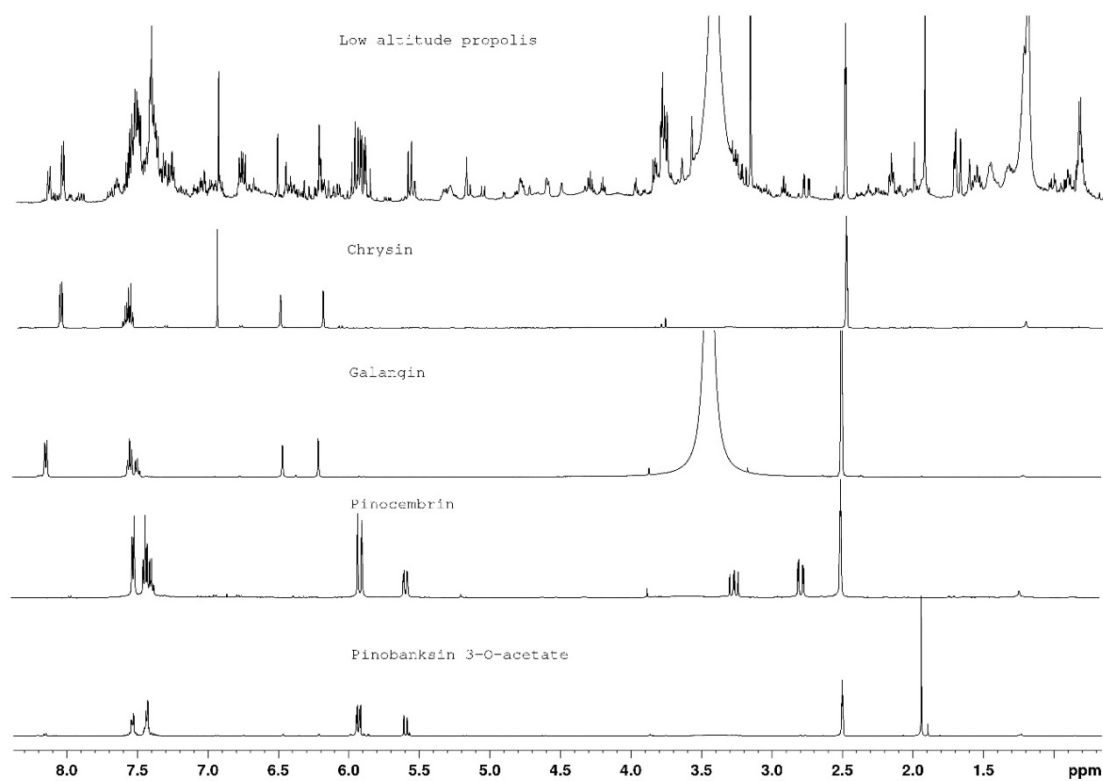


Prilog 2. Usporedni prikaz ^1H NMR spektara uzorka planinskog (BA 5) i ravničarskog propolisa (BA 18) i pojedinačnih galvnihih komponenti.

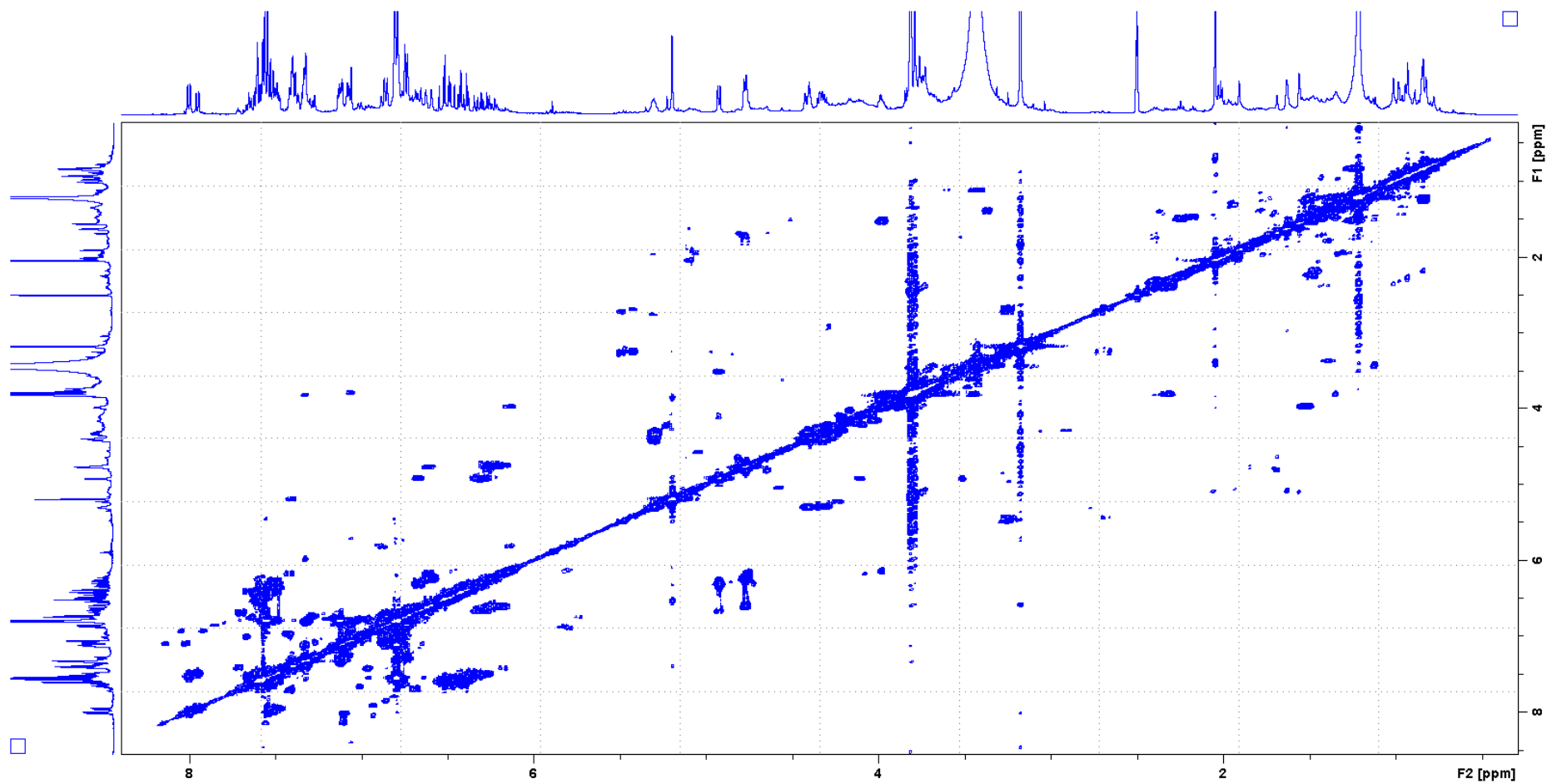
BA 5



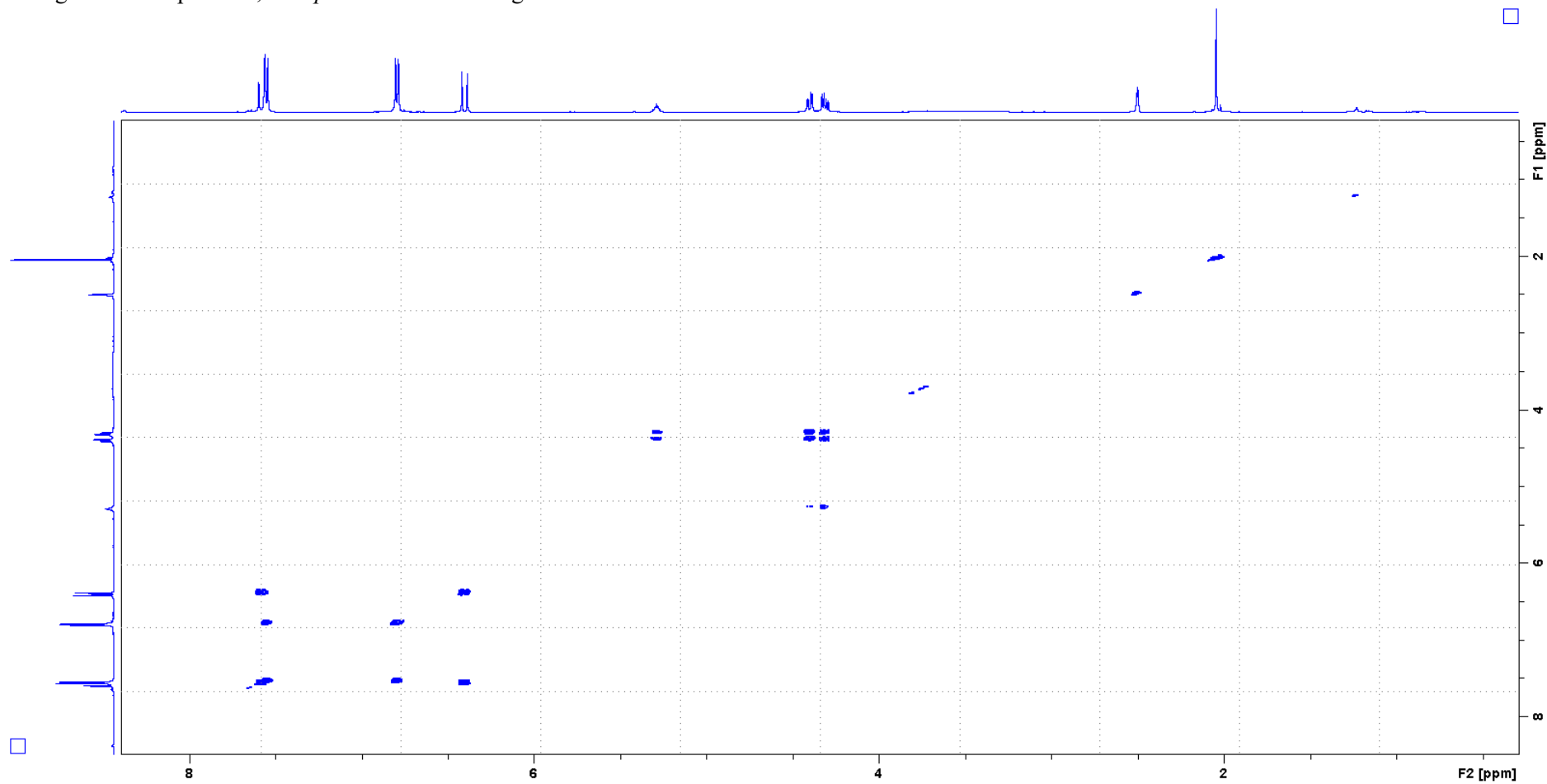
BA 18



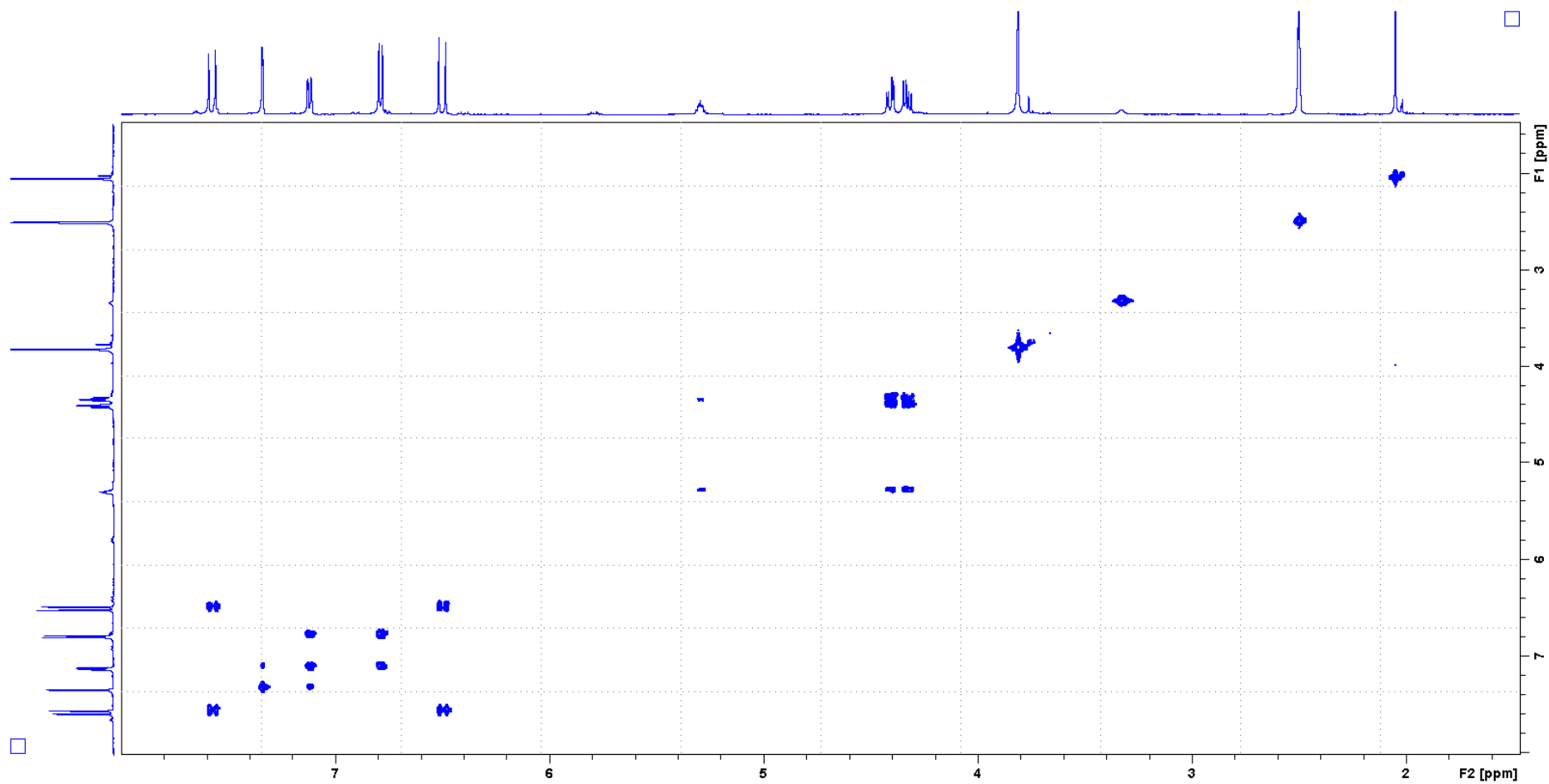
Prilog 3. COSY spektar planinskog propolisa tipa topola (BA5).



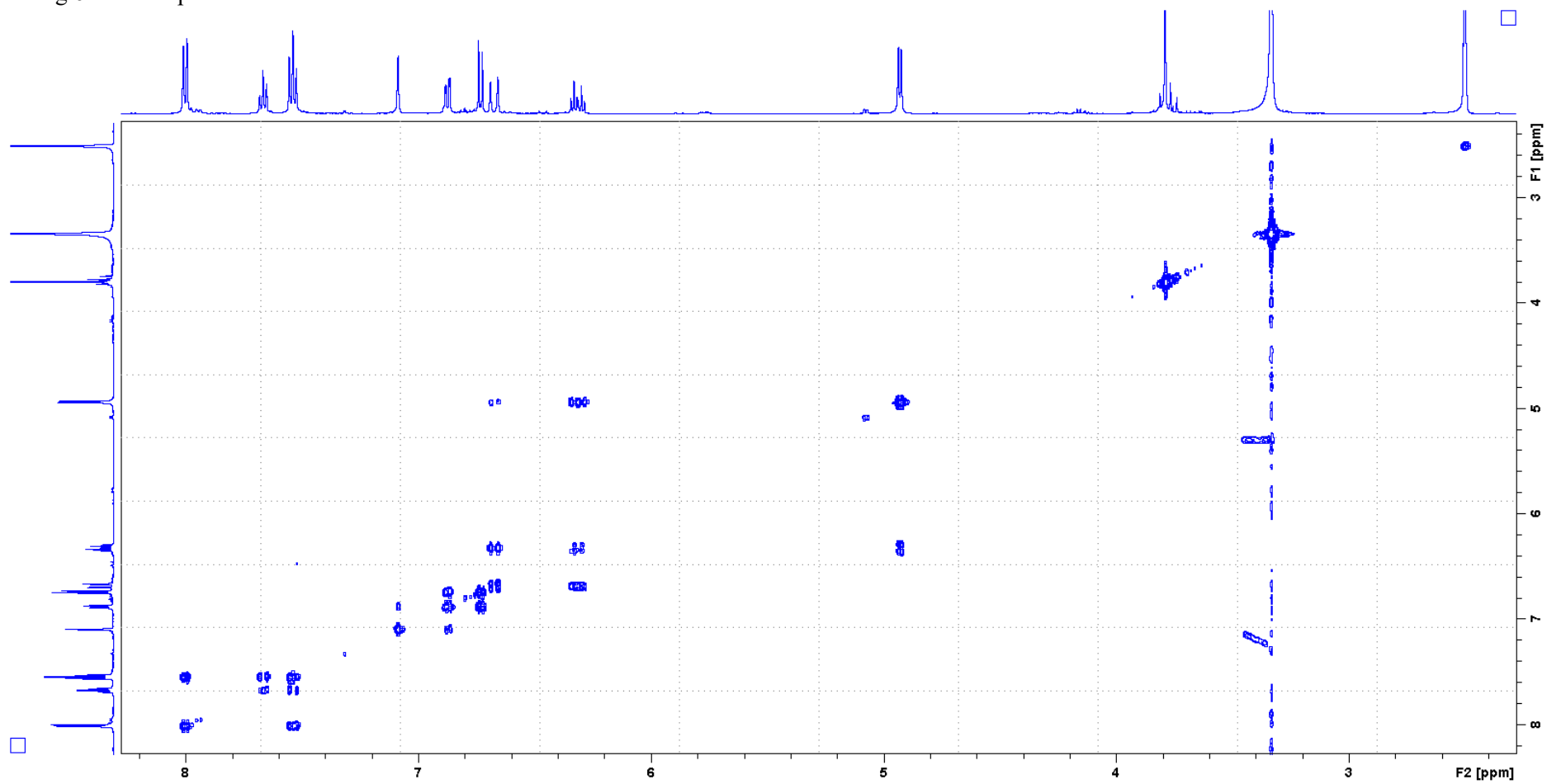
Prilog 4. COSY spektar 1,3- di-*p*-kumaroil-2-acetil-glicerola.



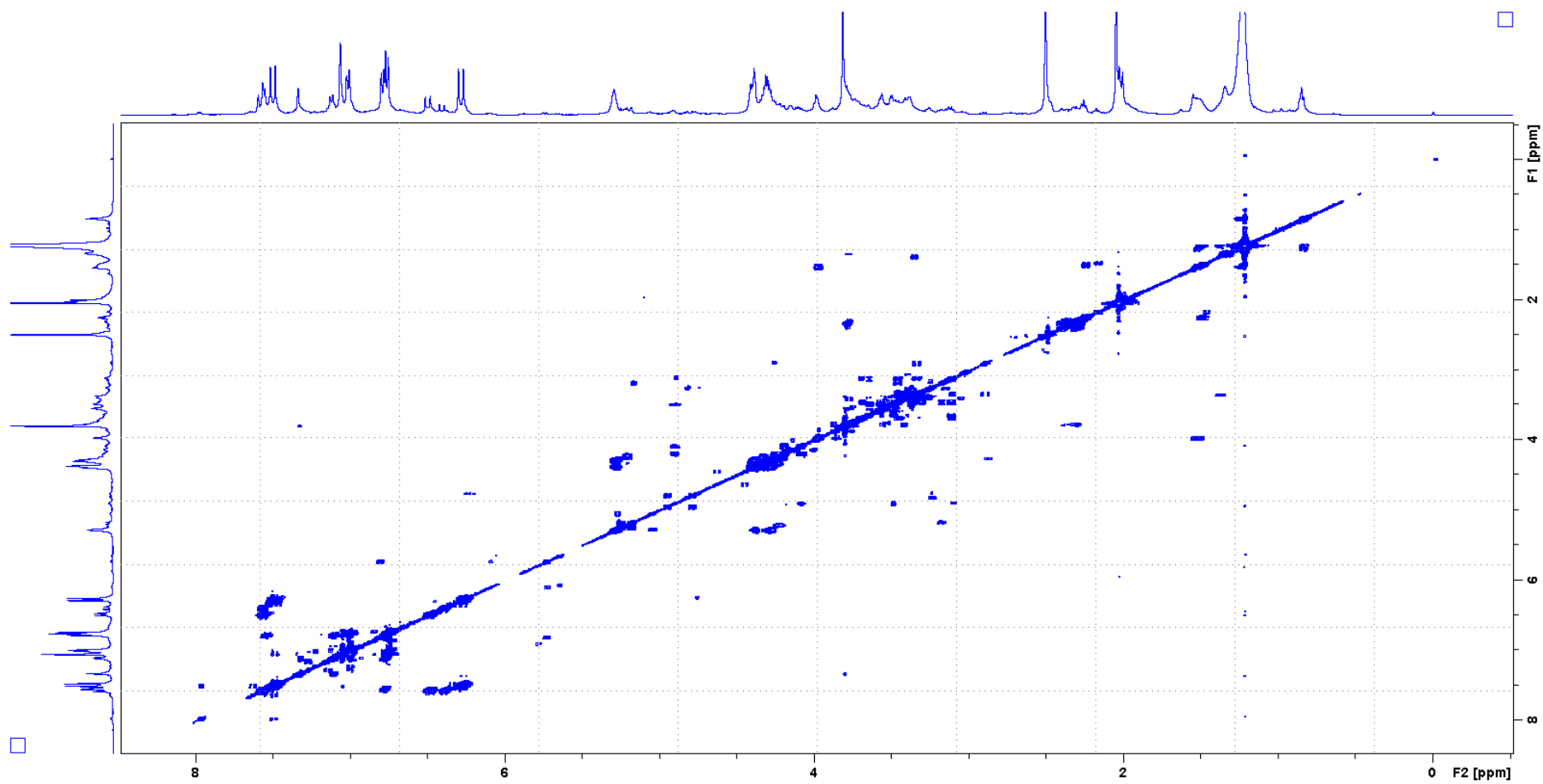
Prilog 5. COSY spektar 1,3- diferuloil-2-acetil-glicerola.



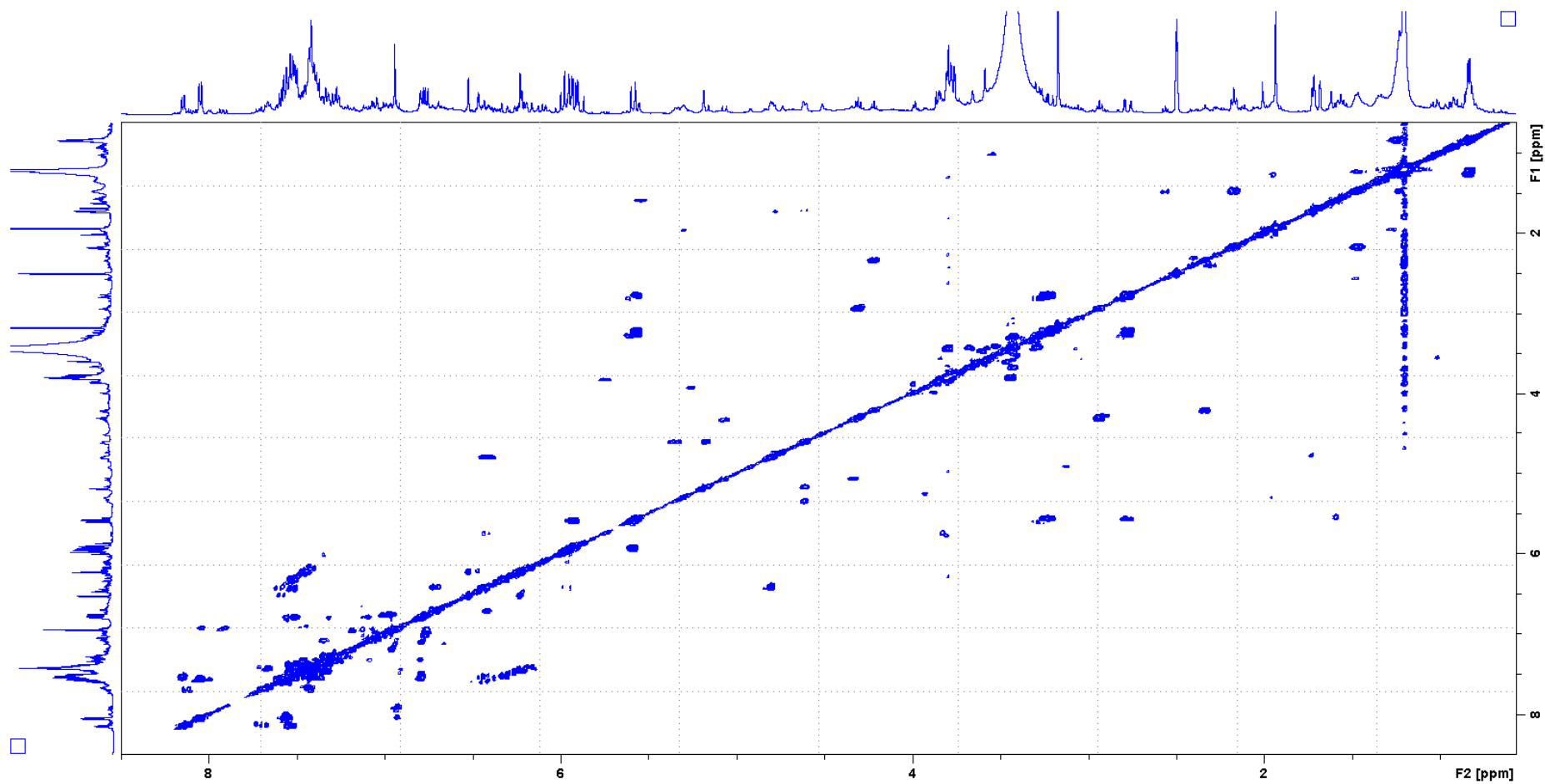
Prilog 6. COSY spektar koniferil benzoata.



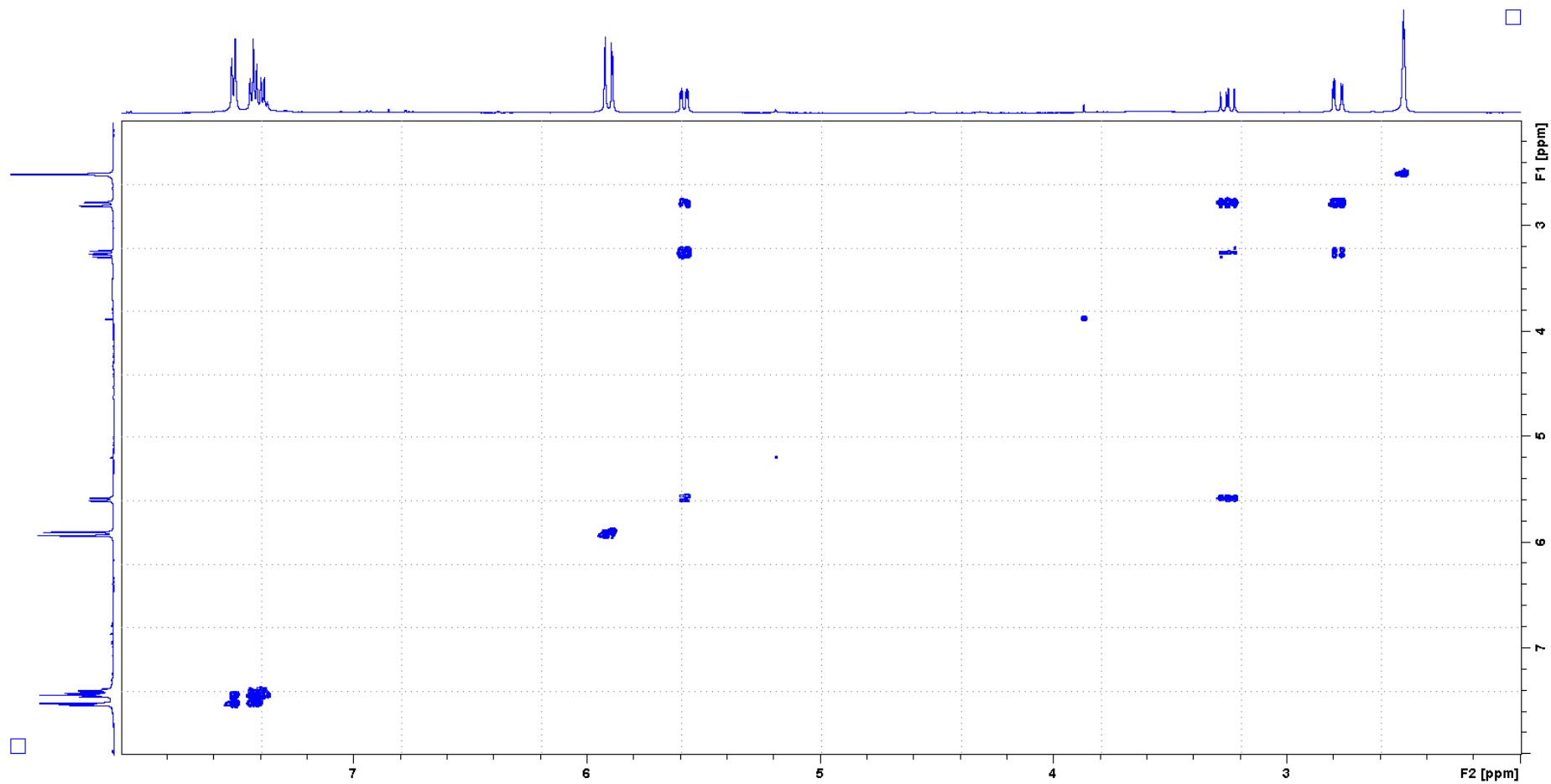
Prilog 7. COSY spektar fenolnih smola pupoljaka *Populus nigra*.



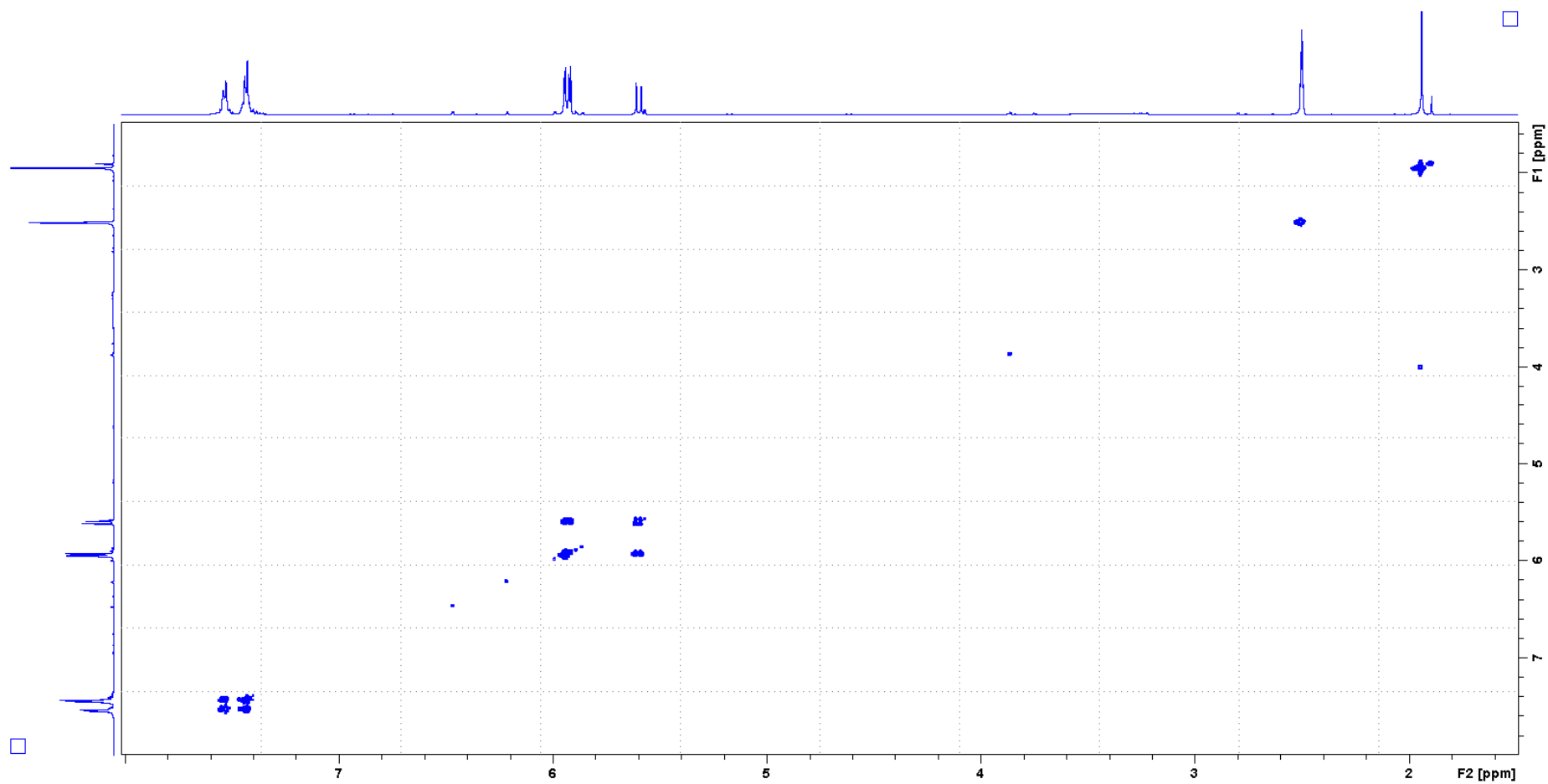
Prilog 8. COSY spektar nizijskog propolisa tipa topola (BA 18).



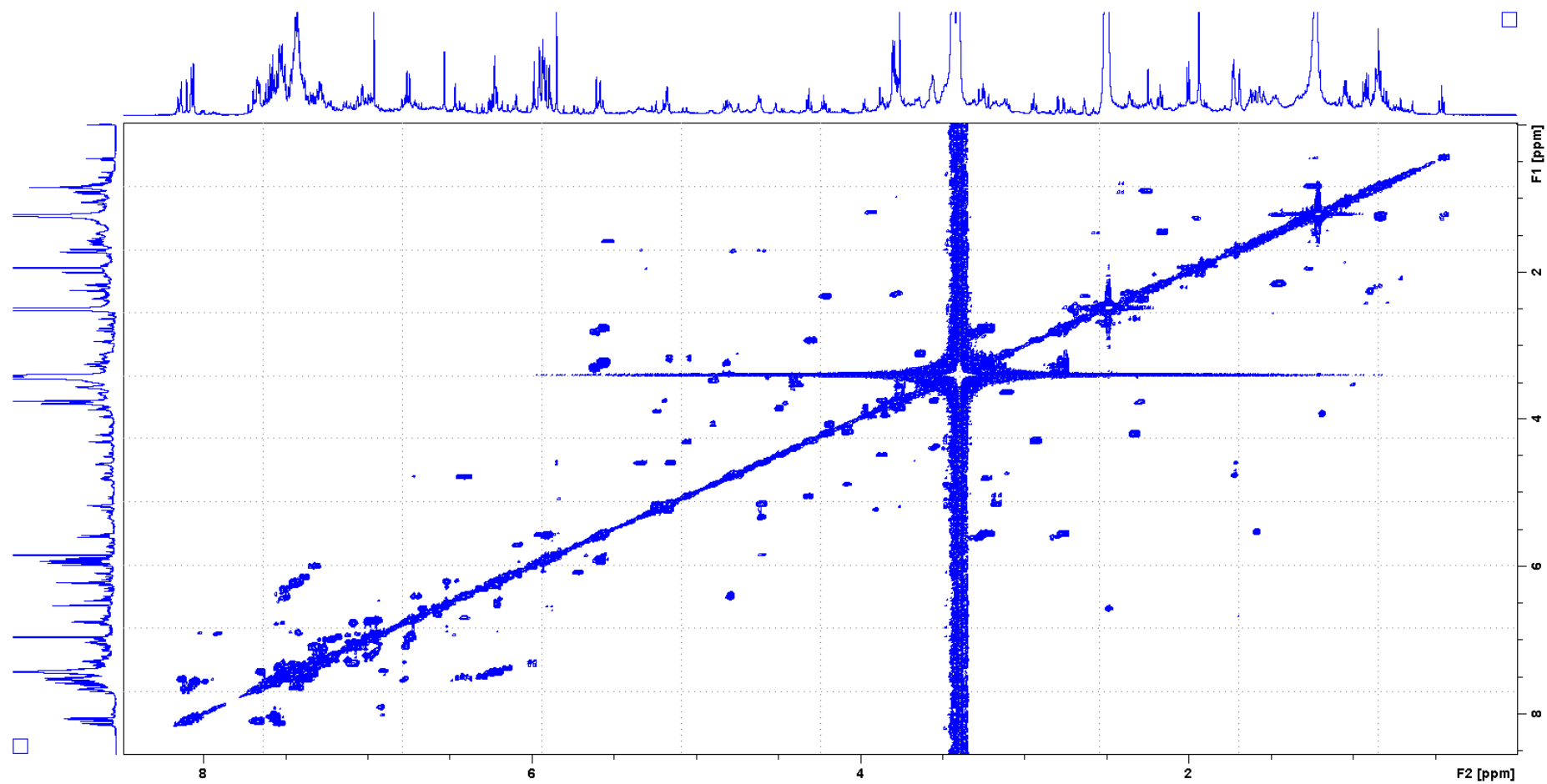
Prilog 9. COSY spektar pinocembrina.



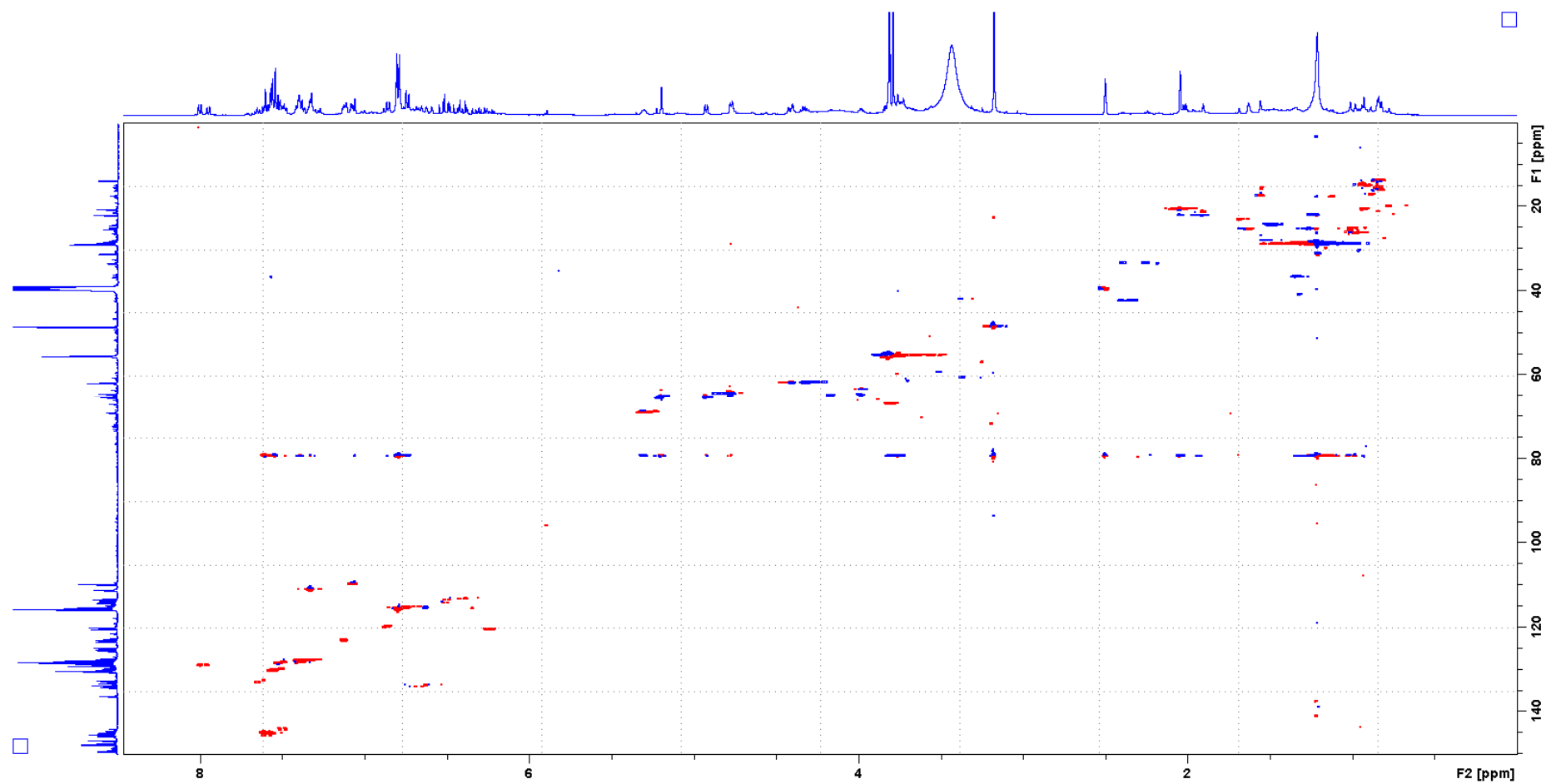
Prilog 10. COSY spektar pinobanksin 3-*O*-acetata.



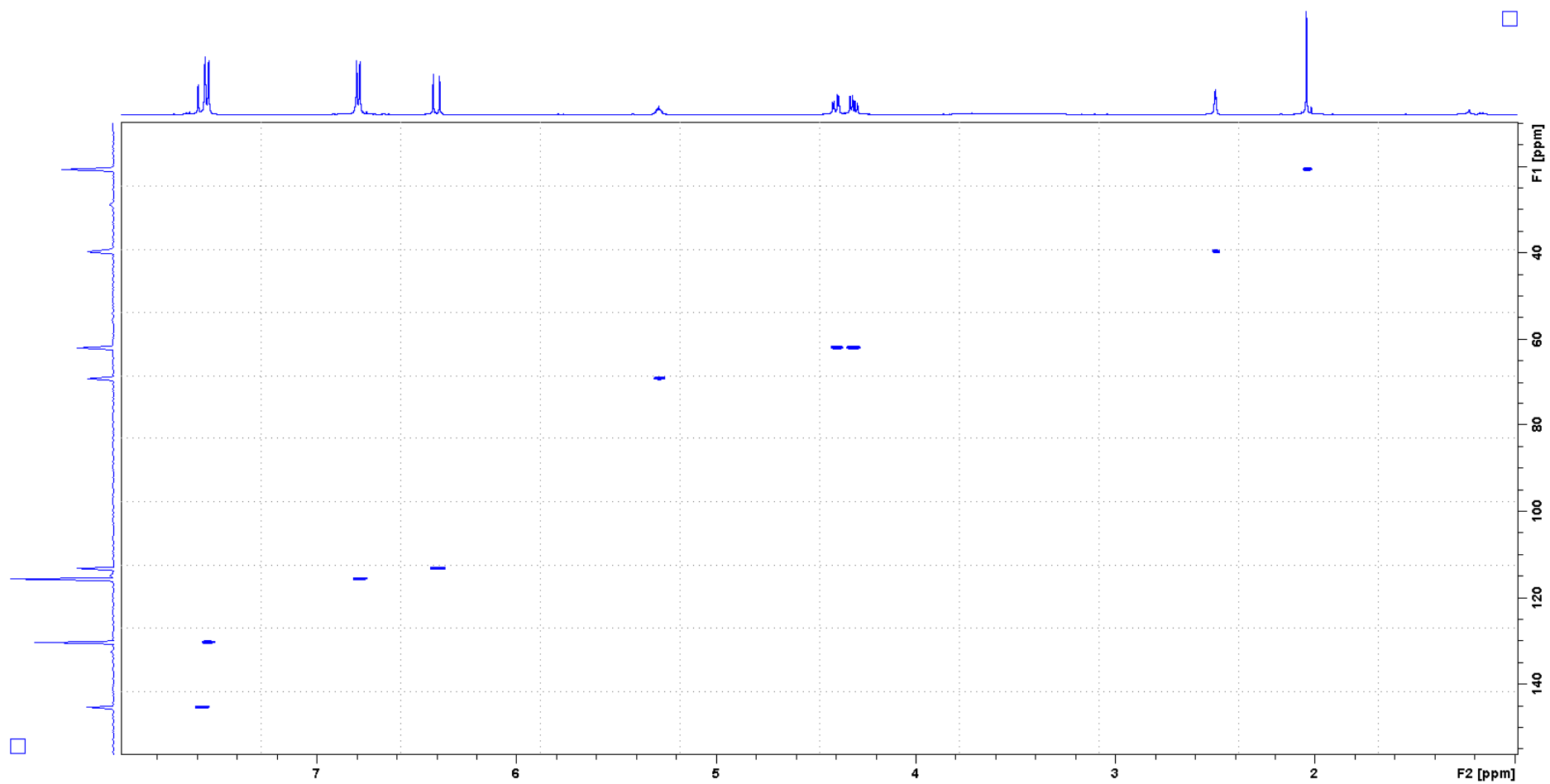
Prilog 11. COSY spektar fenolnih smola pupoljaka *Populus euramericana*.



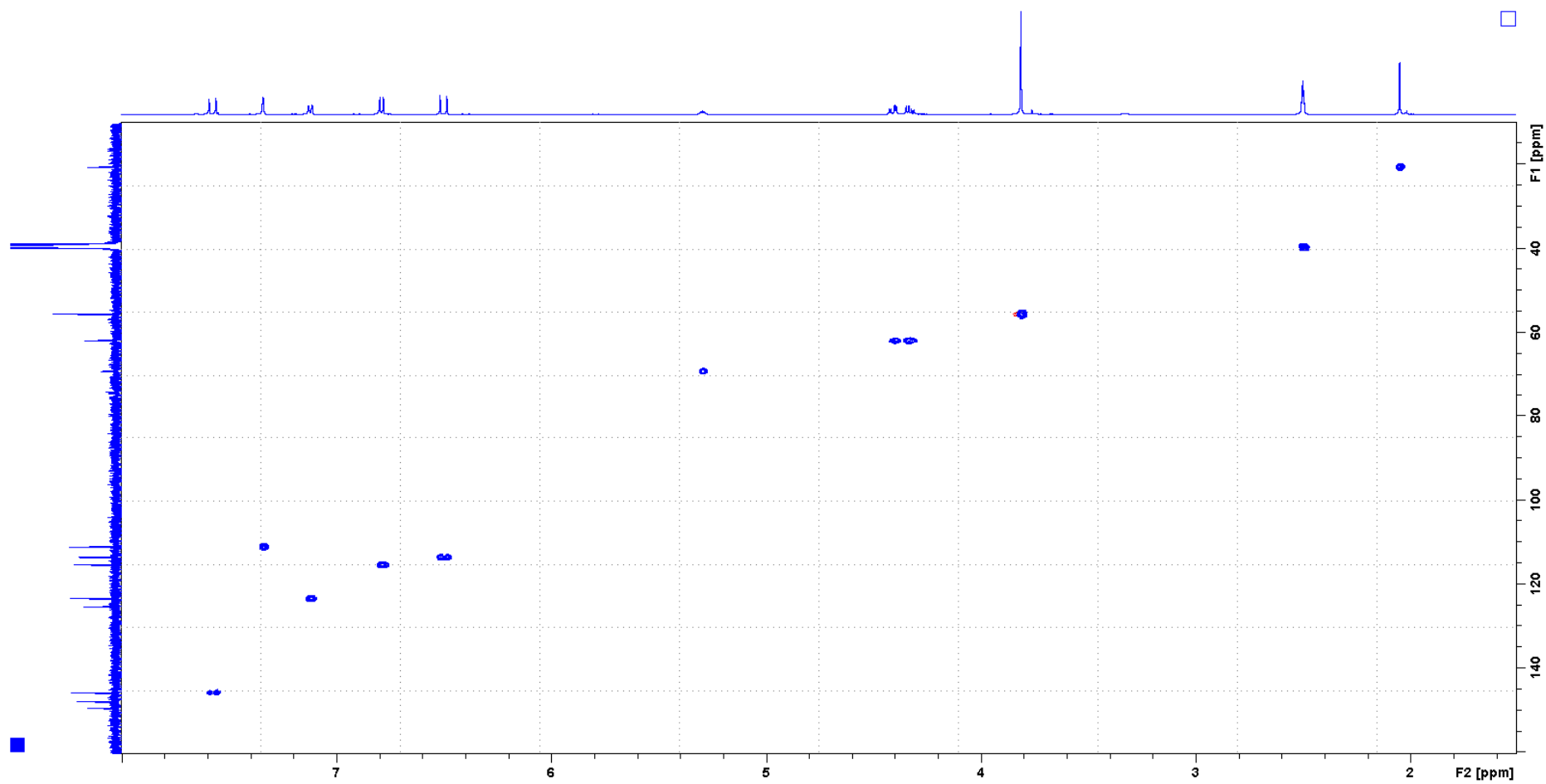
Prilog 12. HSQC spektar planinskog propolisa tipa topola (BA 5).



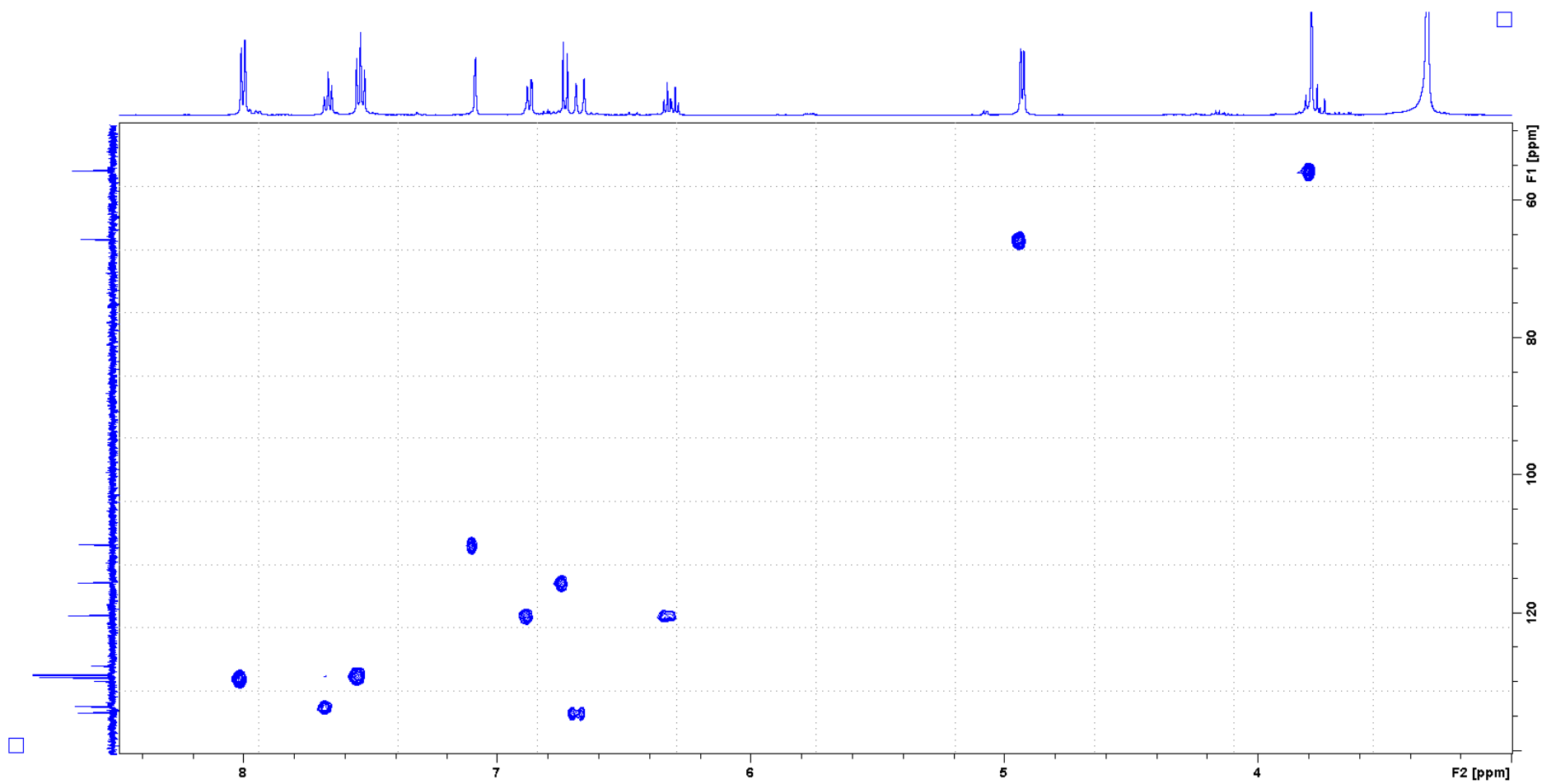
Prilog 13. HSQC spektar 1,3- di-*p*-coumaroil-2-acetil-glicerola.



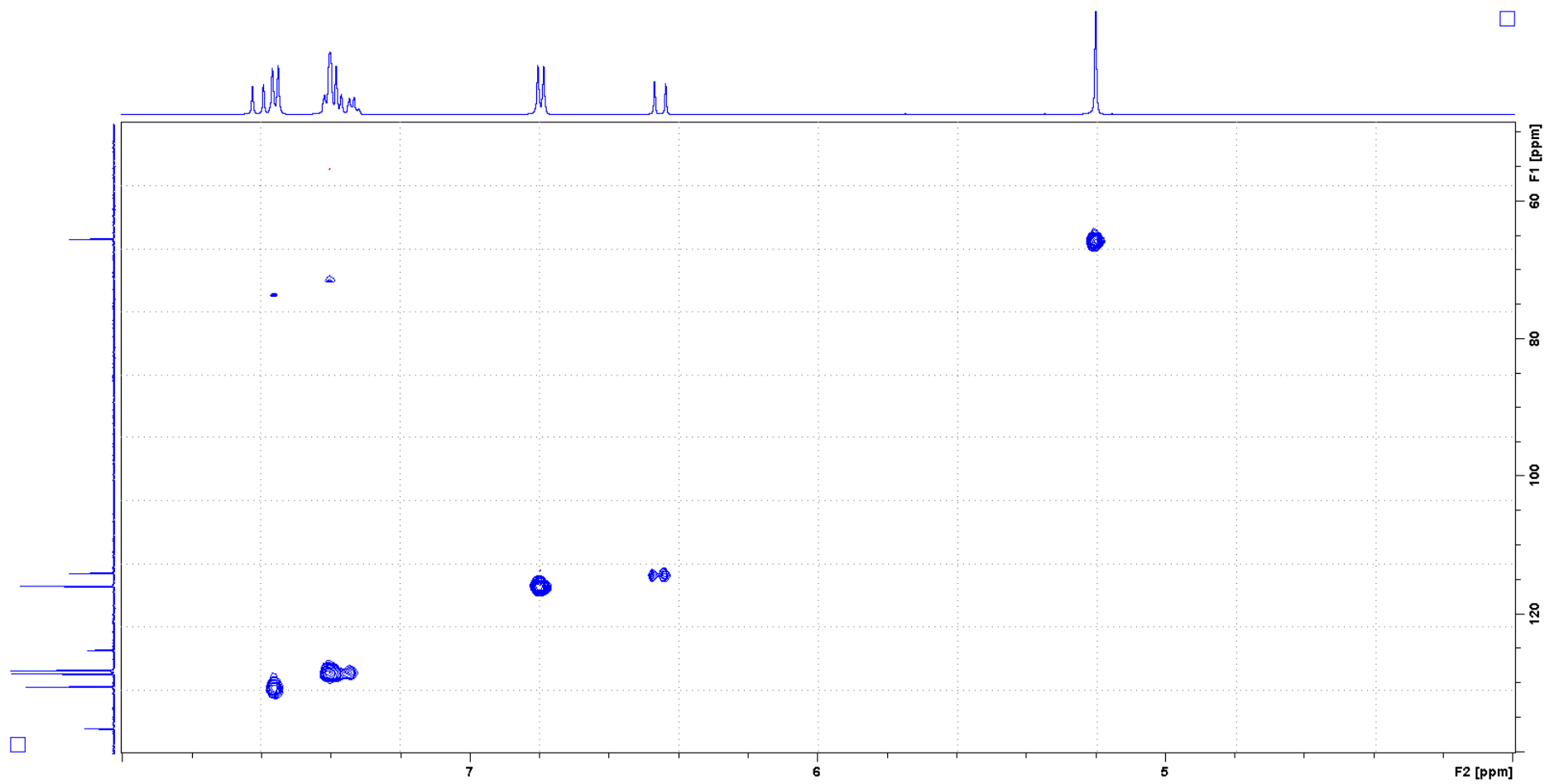
Prilog 14. HSQC spektar 1,3- diferuloil-2-acetil-glicerola.



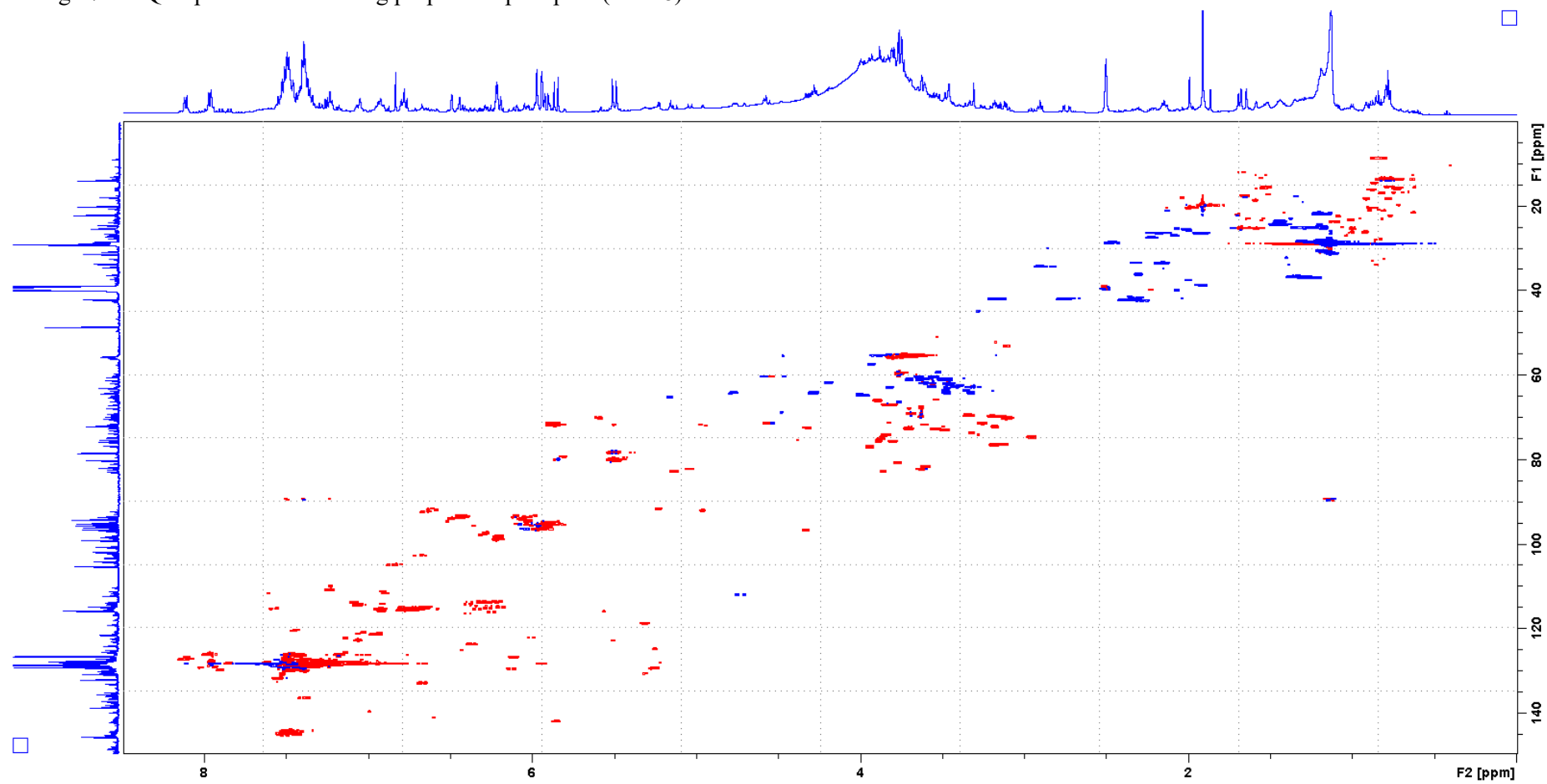
Prilog 15. HSQC spektar koniferil benzoata.



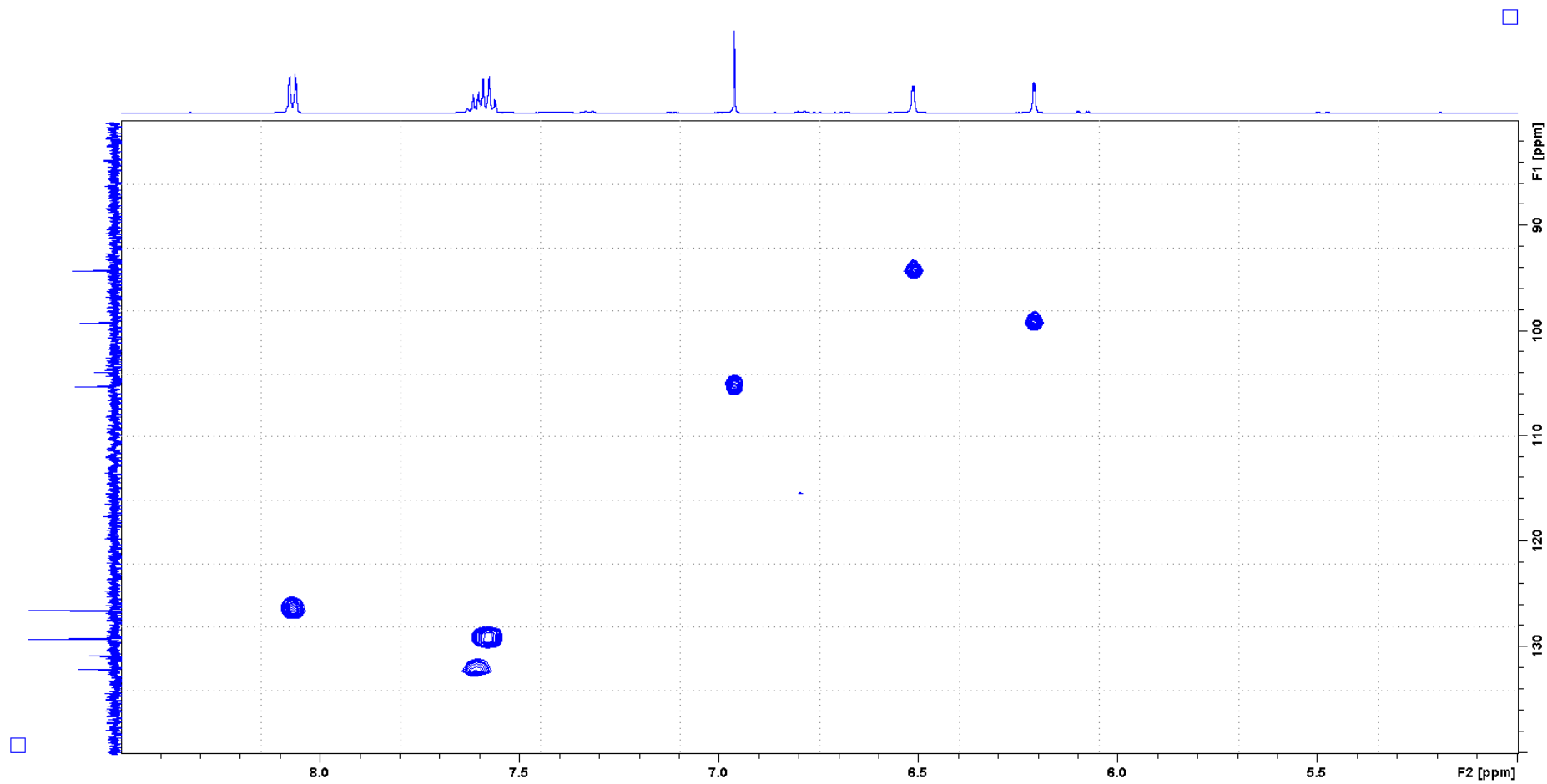
Prilog 16. HSQC spektar benzil kumarata.



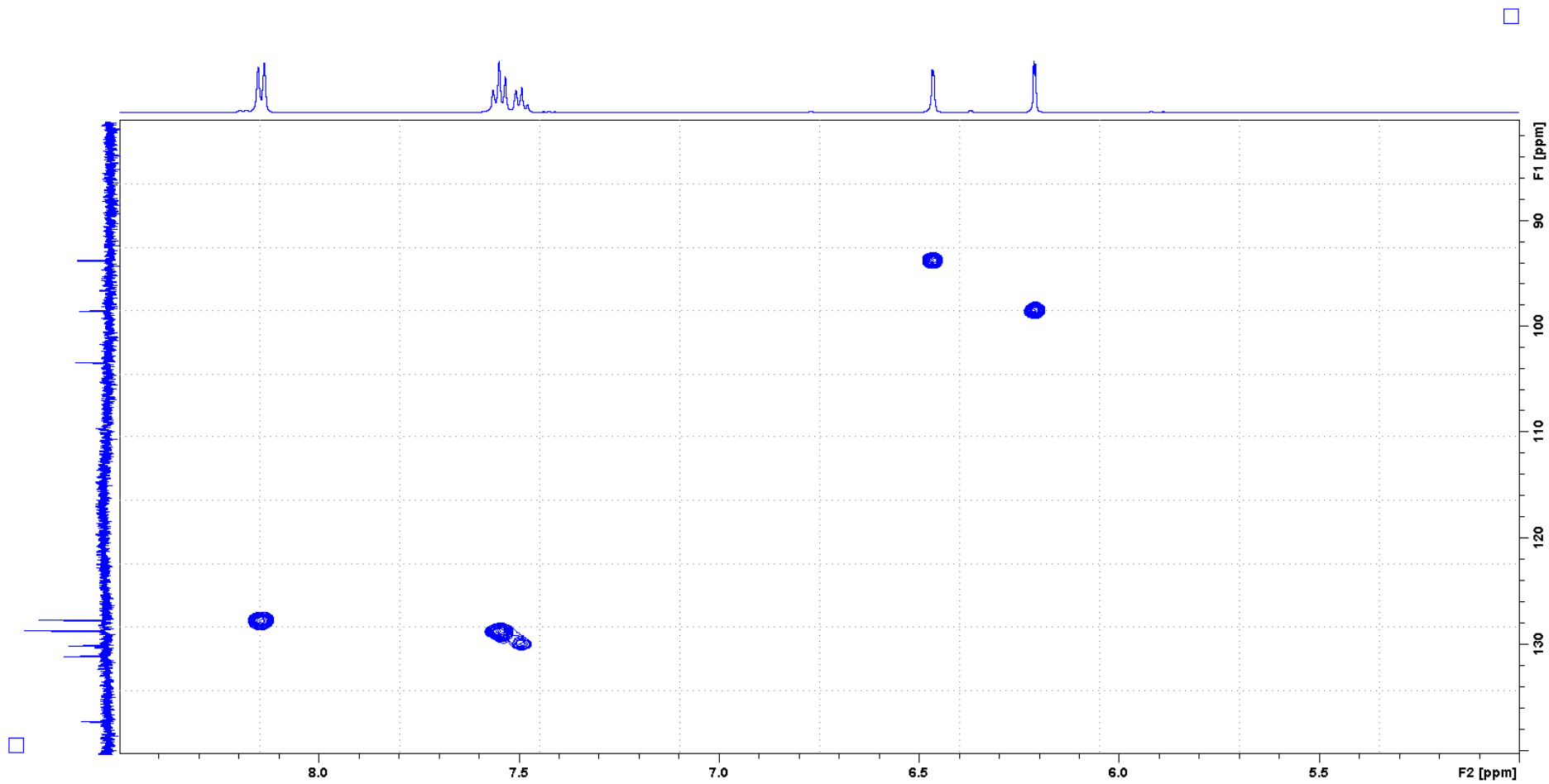
Prilog 17. HSQC spektar ravničarskog propolisa tipa topola (BA 18).



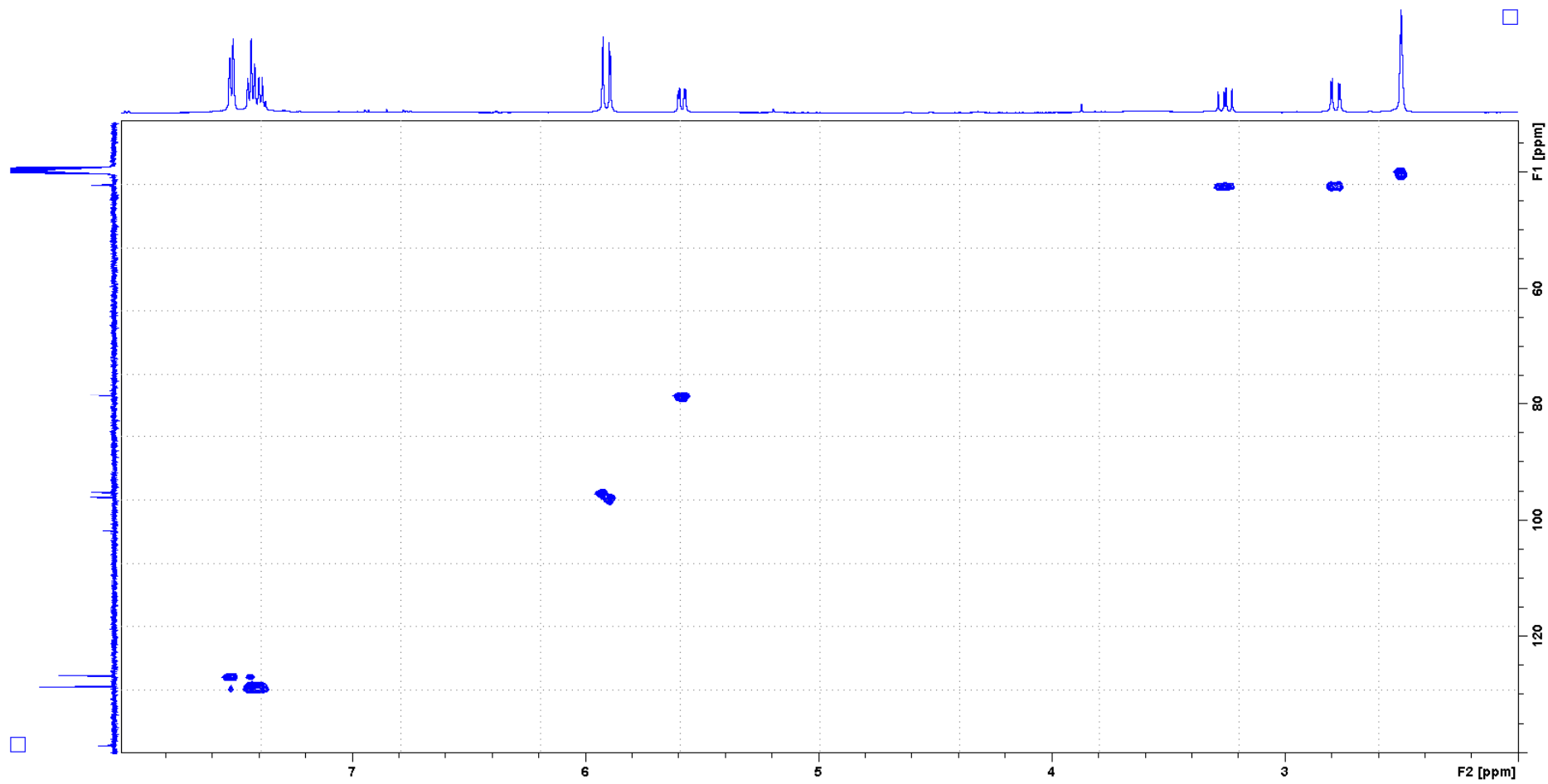
Prilog 18. HSQC spektar hrizina.



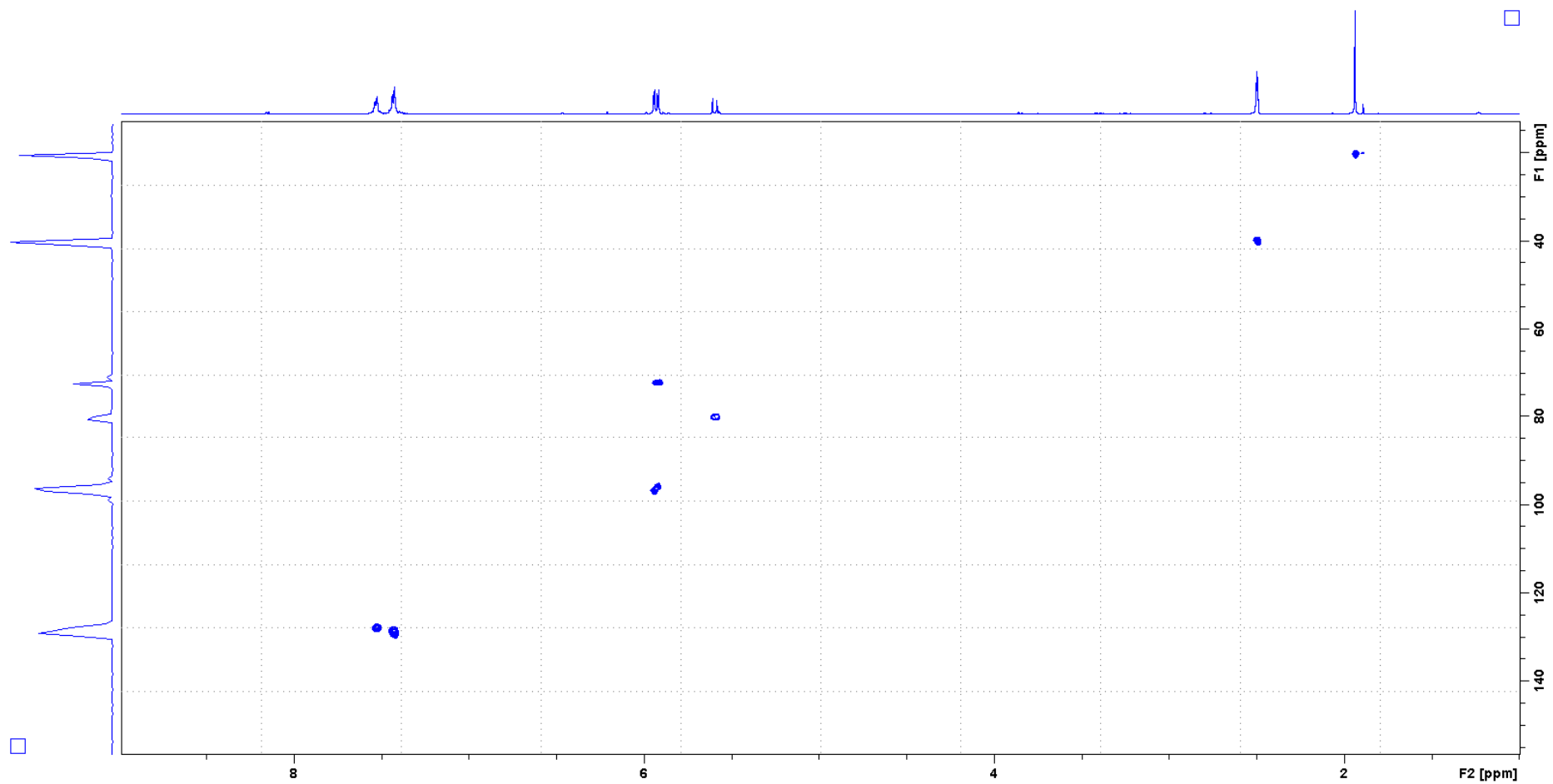
Prilog 19. HSQC spektar galangina.



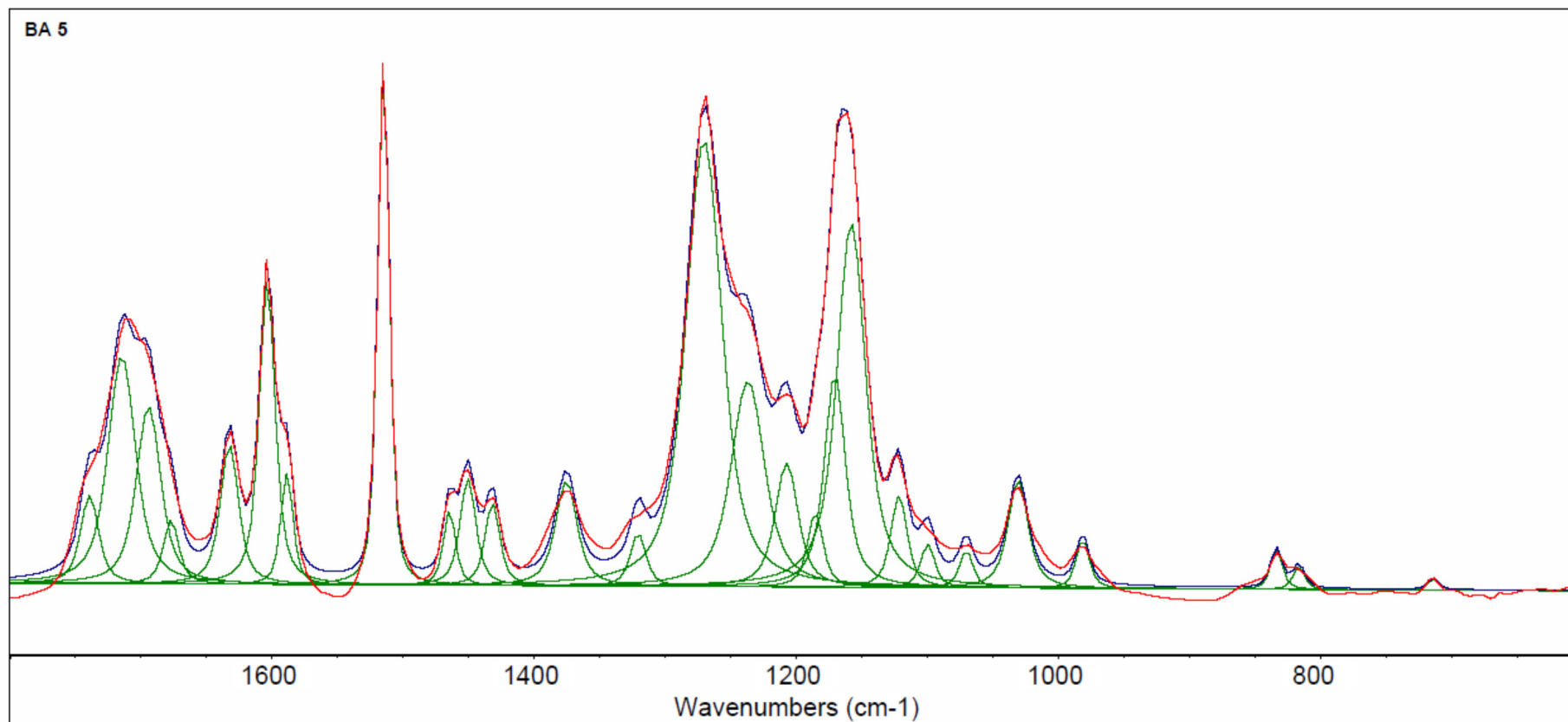
Prilog 20. HSQC spektar pinocembrina.



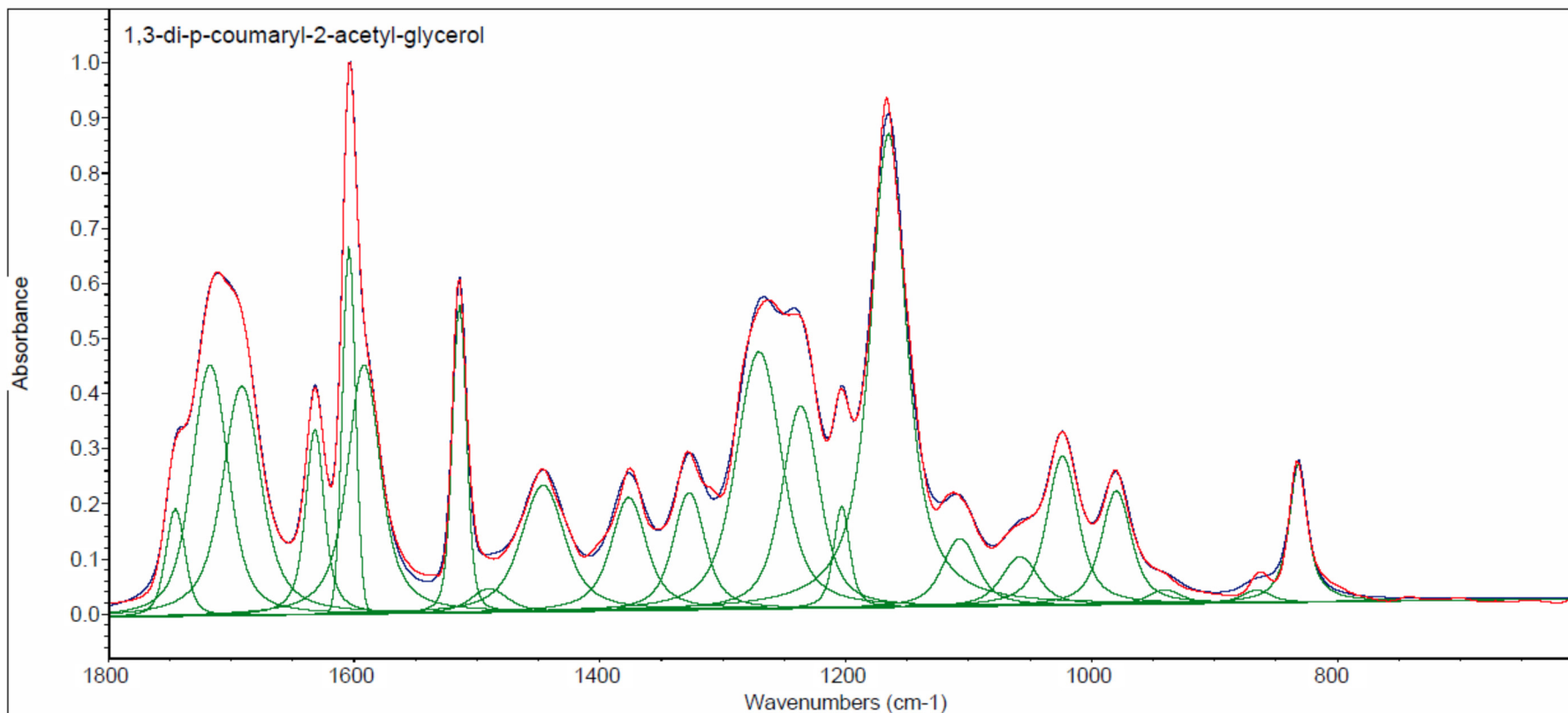
Prilog 21. HSQC spektar pinobanksin 3-*O*-acetata



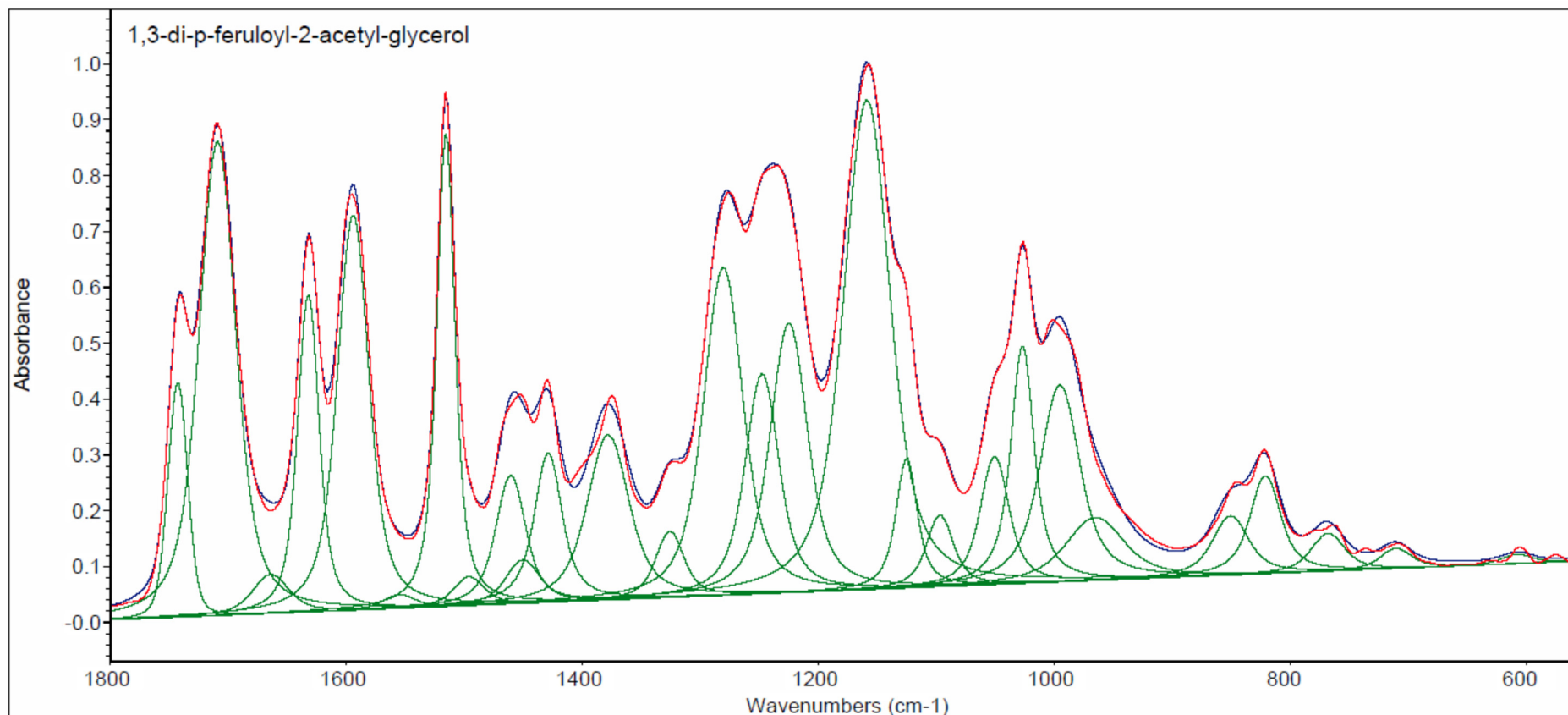
Prilog 22. FTIR spektar planinskog propolisa tipa popola (BA 5) nakon dekonvolucije (plavom bojom je predstavljen originalni spektar, zelenom bojom su prikazani pojedinačni pikovi proizvoda dekonvolucije, a crvena boja predstavlja rezultujući spektar zbira površina pojedinačnih pikova proizvoda dekonvolucije).



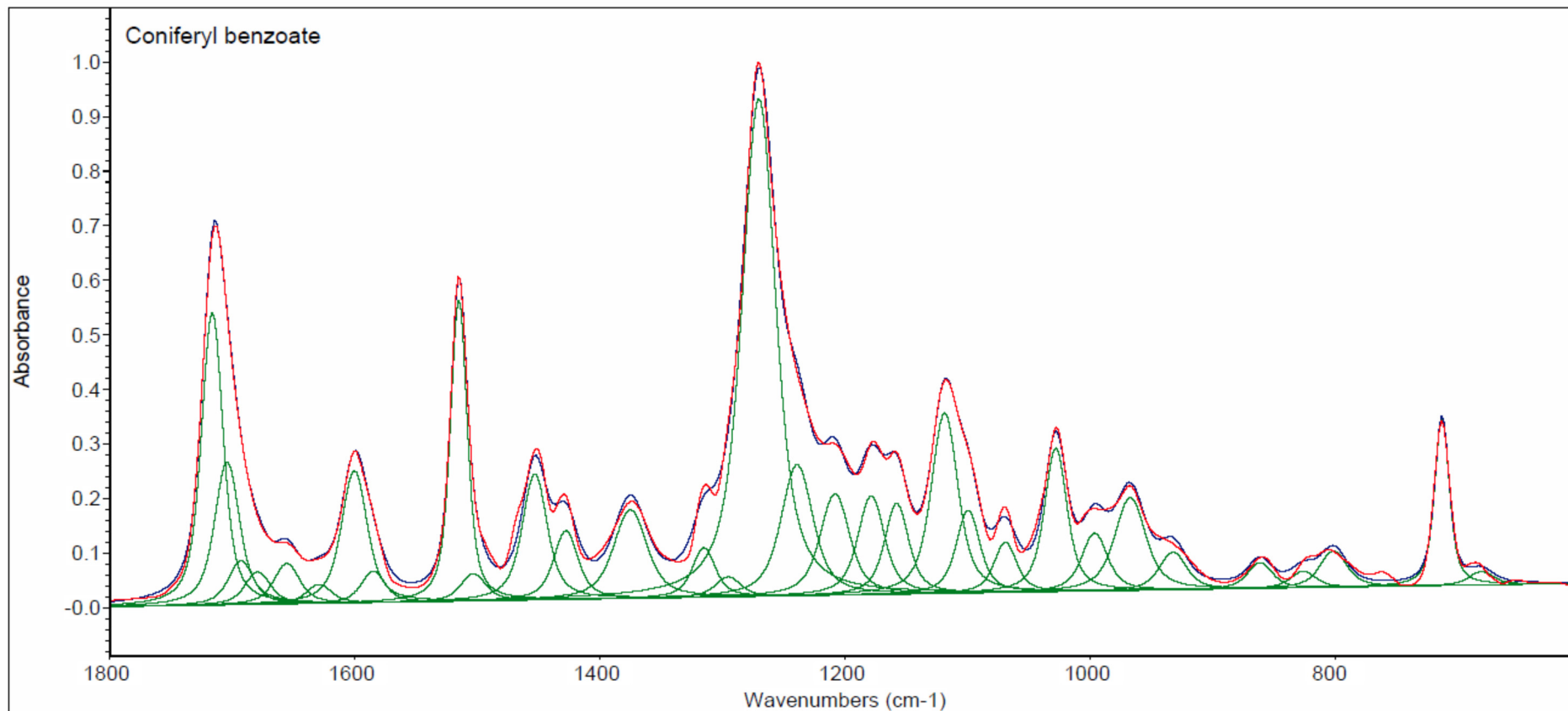
Prilog 23. FTIR spektar 1,3-di-*p*-kumaroil-2-acetil-glicerola nakon dekonvolucije (plavom bojom je predstavljen originalni spektar, zelenom bojom su prikazani pojedinačni pikovi proizvoda dekonvolucije, a crvena boja predstavlja rezultujući spektar zbira površina pojedinačnih pikova proizvoda dekonvolucije).



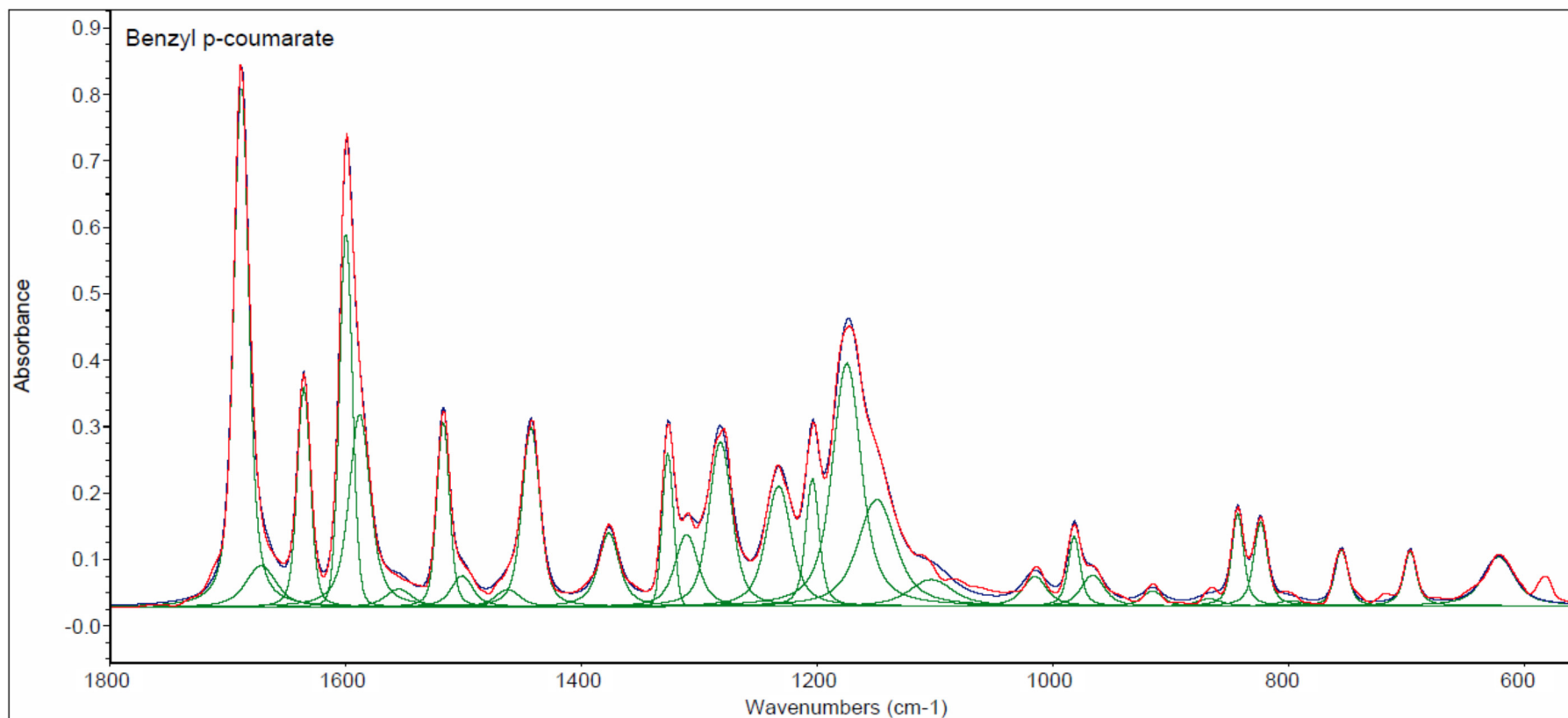
Prilog 24. FTIR spektar 1,3-di-feruloil-2-acetil-glicerola nakon dekonvolucije (plavom bojom je predstavljen originalni spektar, zelenom bojom su prikazani pojedinačni pikovi proizvoda dekonvolucije, a crvena boja predstavlja rezultujući spektar zbira površina pojedinačnih pikova proizvoda dekonvolucije).



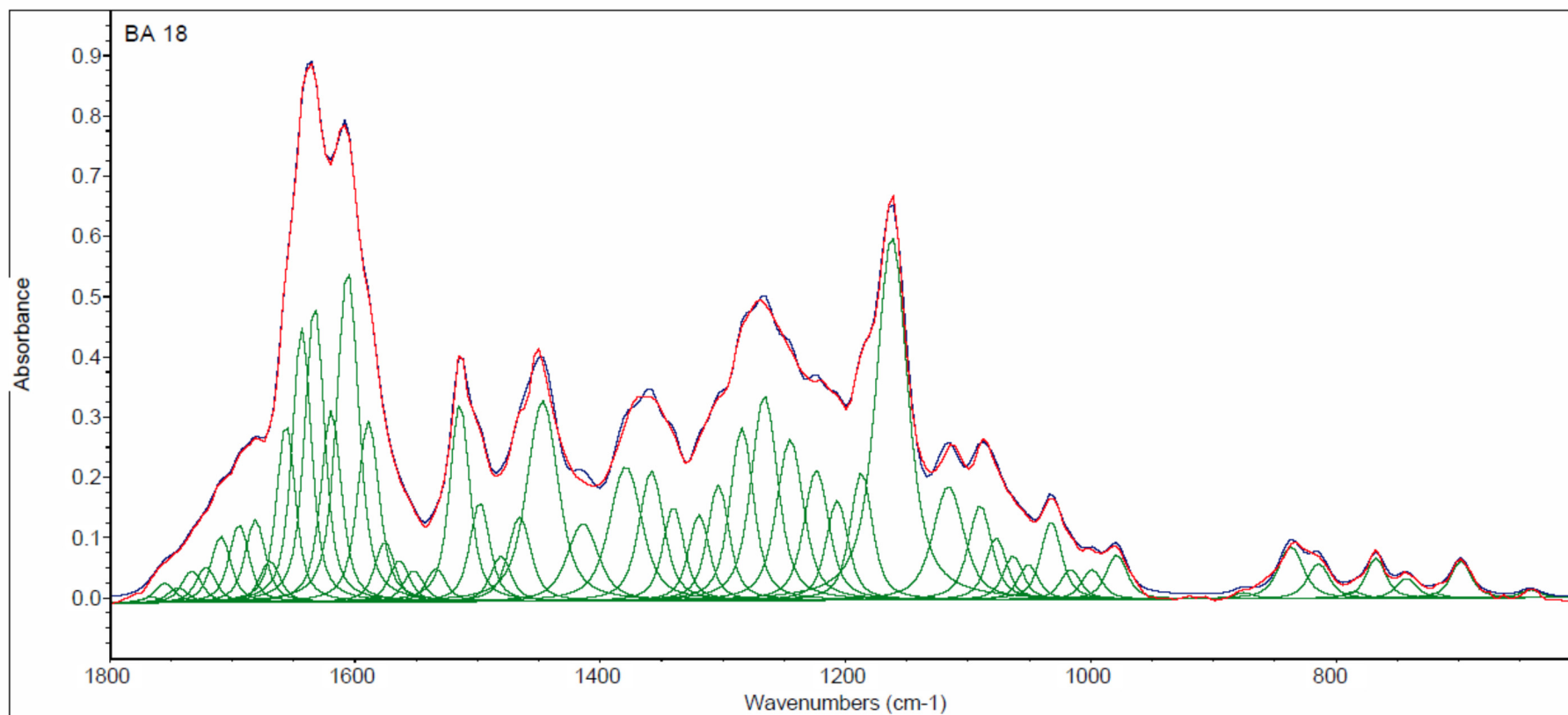
Prilog 25. FTIR spektar koniferyl benzoata nakon dekonvolucije (plavom bojom je predstavljen originalni spektar, zelenom bojom su prikazani pojedinačni pikovi proizvoda dekonvolucije, a crvena boja predstavlja rezultujući spektar zbira površina pojedinačnih pikova proizvoda dekonvolucije).



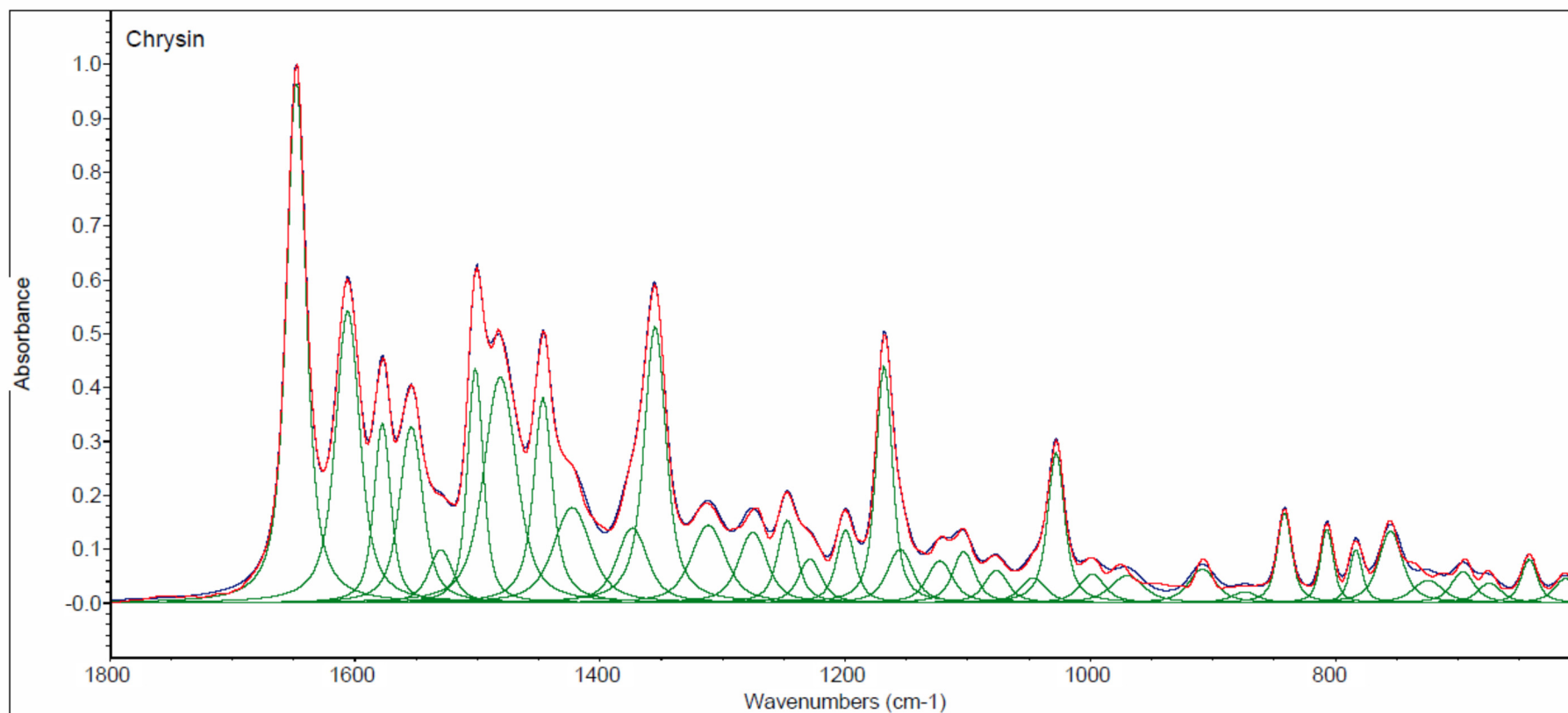
Prilog 26. FTIR spektar benzil *p*-kumarata nakon dekonvolucije (plavom bojom je predstavljen originalni spektar, zelenom bojom su prikazani pojedinačni pikovi proizvoda dekonvolucije, a crvena boja predstavlja rezultujući spektar zbira površina pojedinačnih pikova proizvoda dekonvolucije).



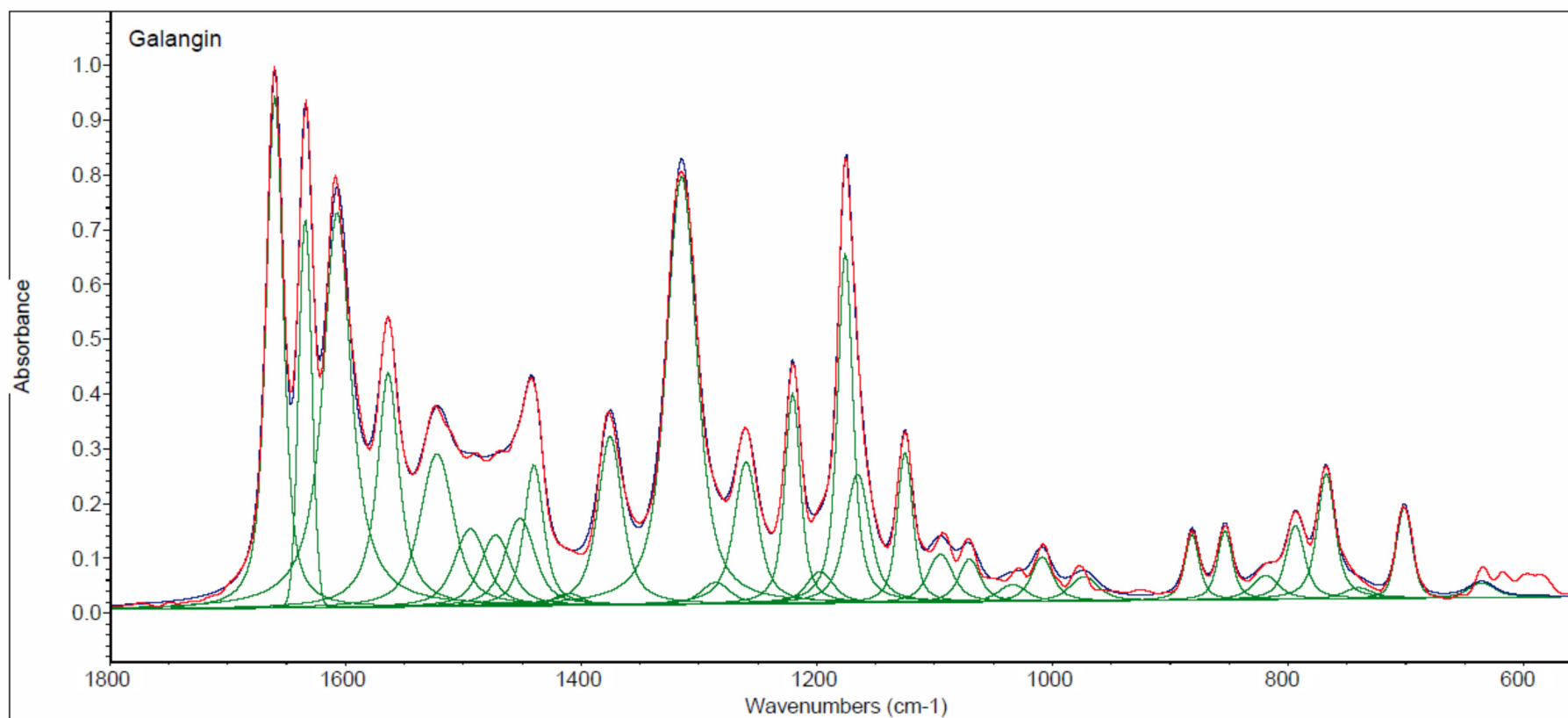
Prilog 27. FTIR spektar ravničarskog propolisa tipa topola (BA 18) nakon dekonvolucije (plavom bojom je predstavljen originalni spektar, zelenom bojom su prikazani pojedinačni pikovi proizvoda dekonvolucije, a crvena boja predstavlja rezultujući spektar zbira površina pojedinačnih pikova proizvoda dekonvolucije).



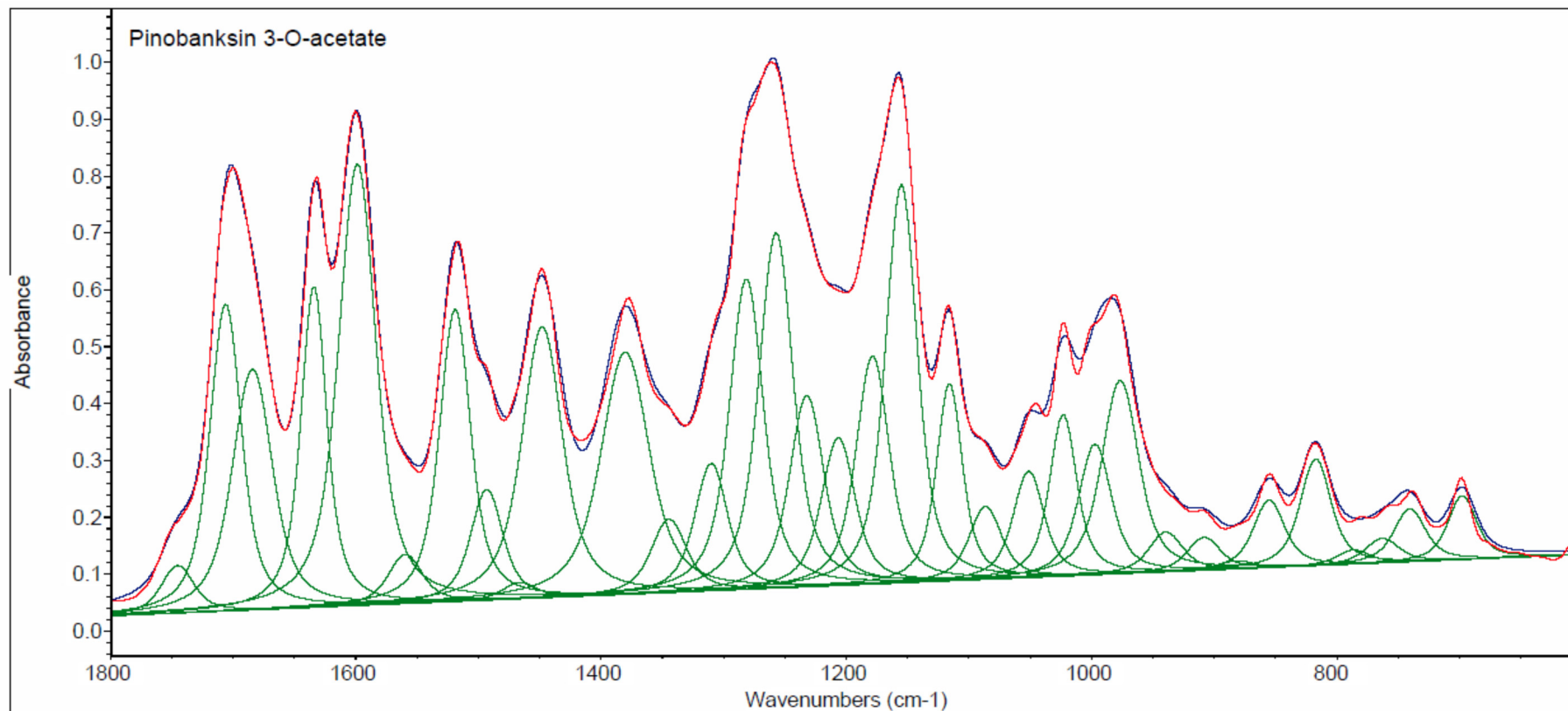
Prilog 28. FTIR spektar hrizina nakon dekonvolucije (plavom bojom je predstavljen originalni spektar, zelenom bojom su prikazani pojedinačni pikovi proizvoda dekonvolucije, a crvena boja predstavlja rezultujući spektar zbira površina pojedinačnih pikova proizvoda dekonvolucije).



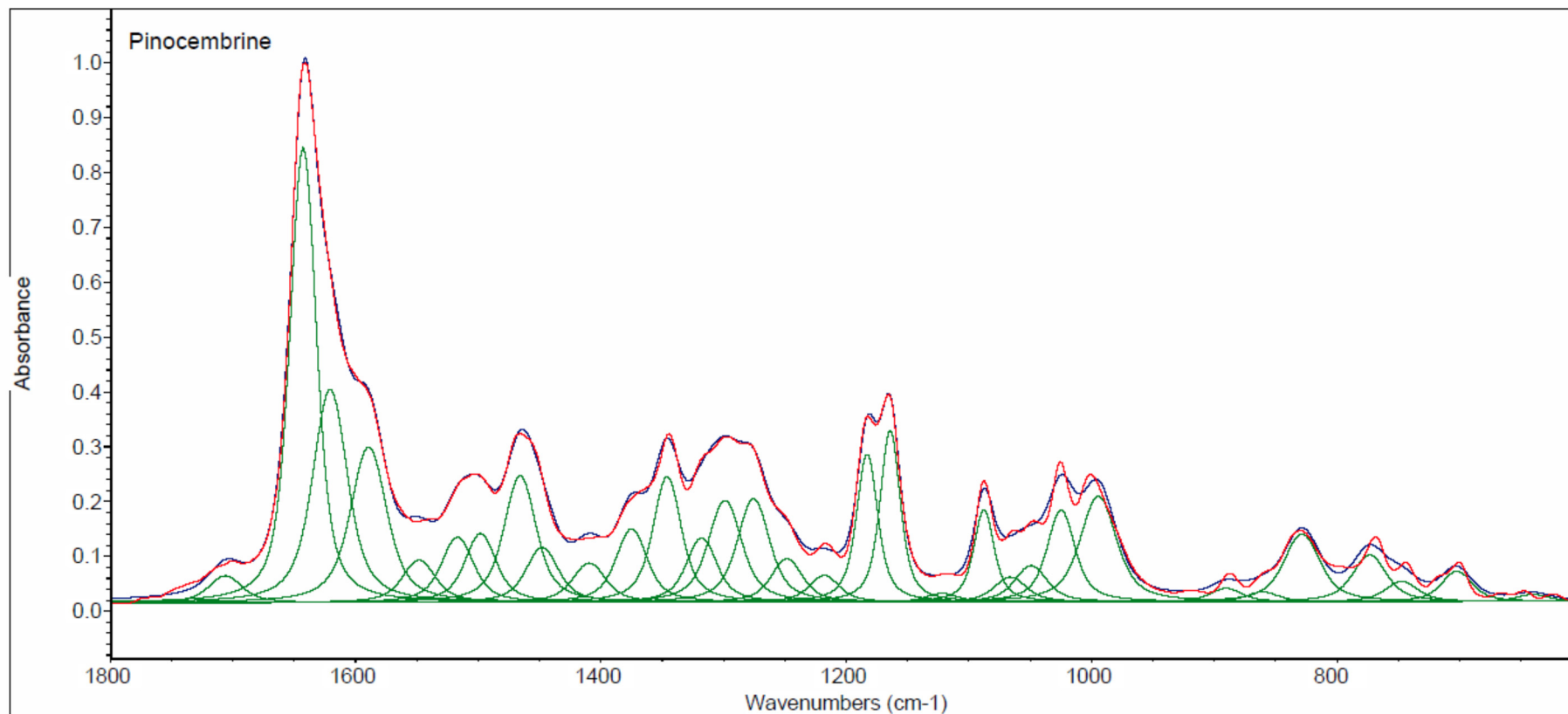
Prilog 29. FTIR spektar galangina nakon dekonvolucije (plavom bojom je predstavljen originalni spektar, zelenom bojom su prikazani pojedinačni pikovi proizvoda dekonvolucije, a crvena boja predstavlja rezultujući spektar zbira površina pojedinačnih pikova proizvoda dekonvolucije).



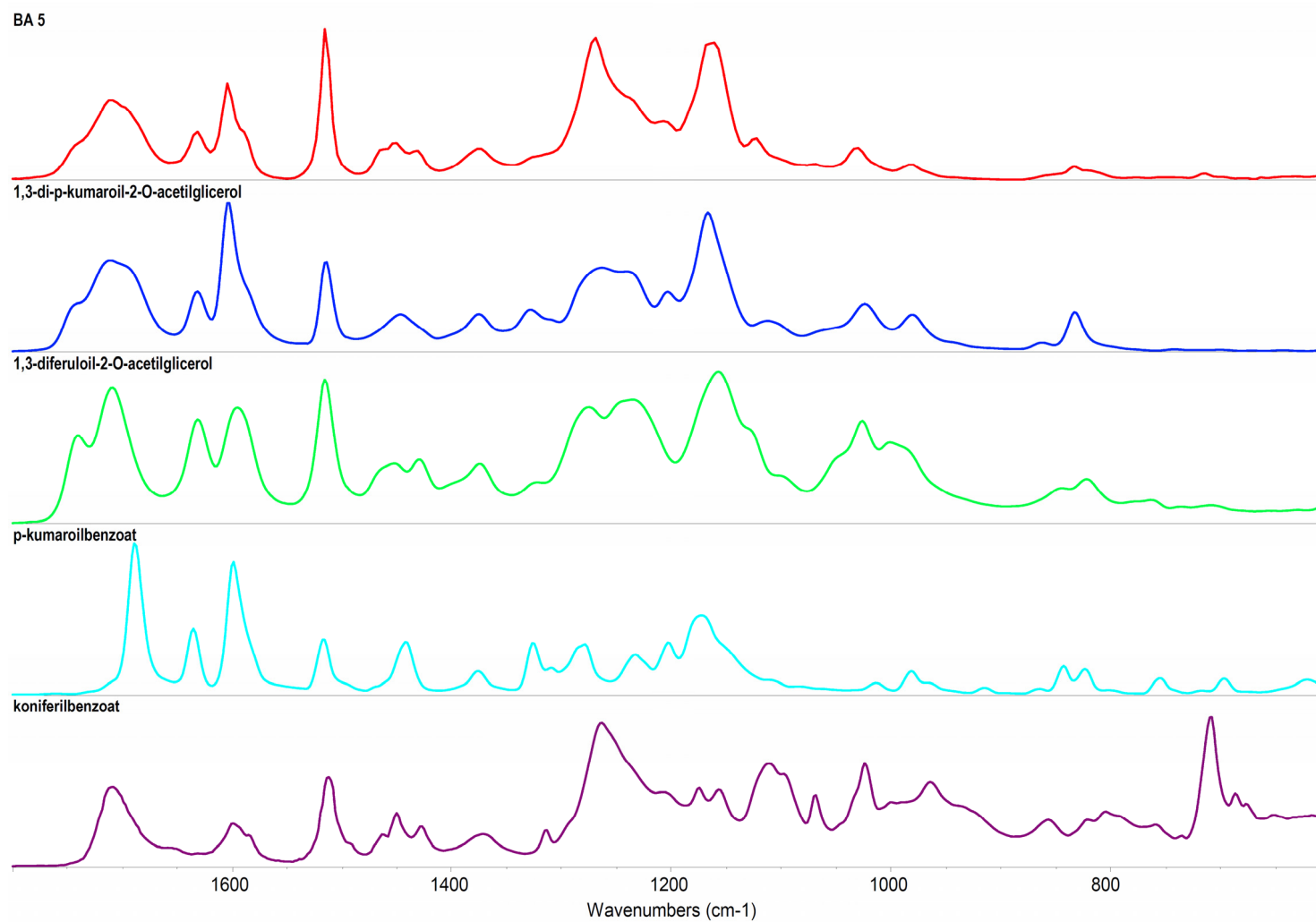
Prilog 30. FTIR spektar pinobanksin 3-*O*-acetata nakon dekonvolucije (plavom bojom je predstavljen originalni spektar, zelenom bojom su prikazani pojedinačni pikovi proizvoda dekonvolucije, a crvena boja predstavlja rezultujući spektar zbira površina pojedinačnih pikova proizvoda dekonvolucije).



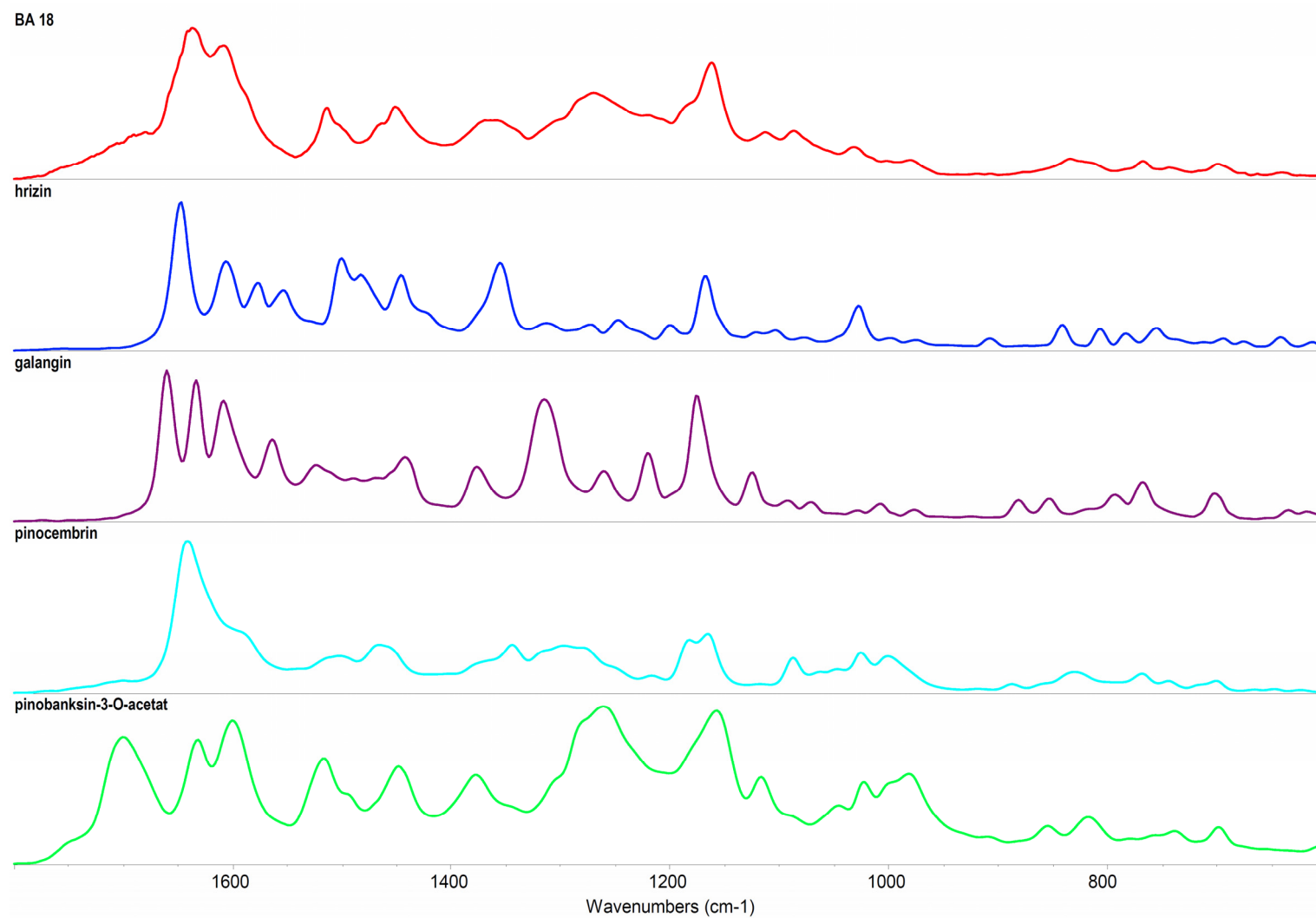
Prilog 31. FTIR spektar pinocembrina nakon dekonvolucije (plavom bojom je predstavljen originalni spektar, zelenom bojom su prikazani pojedinačni pikovi proizvoda dekonvolucije, a crvena boja predstavlja rezultujući spektar zbira površina pojedinačnih pikova proizvoda dekonvolucije).



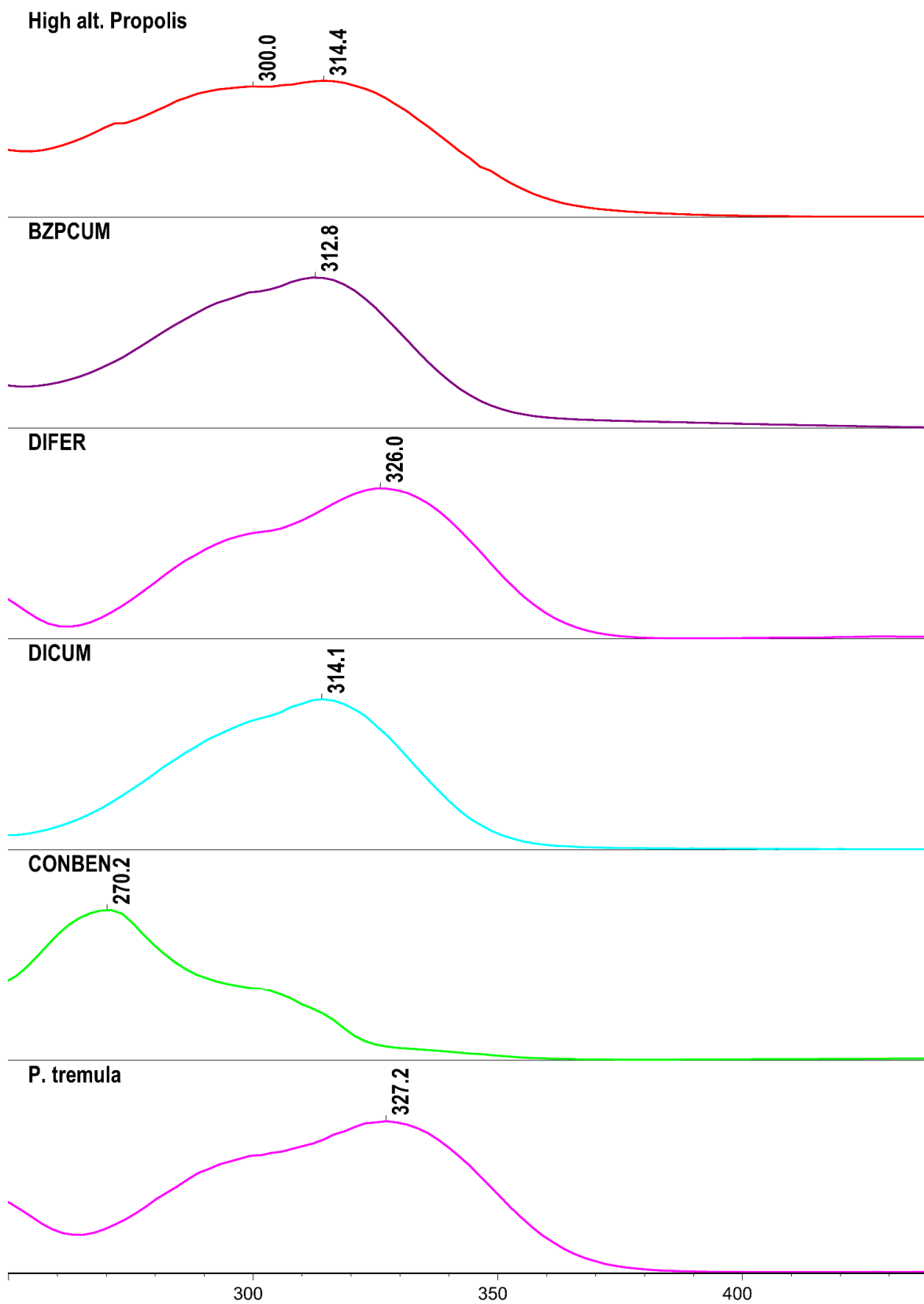
Prilog 32. Usporedni prikaz FTIR spektara planinskog propolisa tipa topola (BA 5) i dominantnih komponenti u njemu.



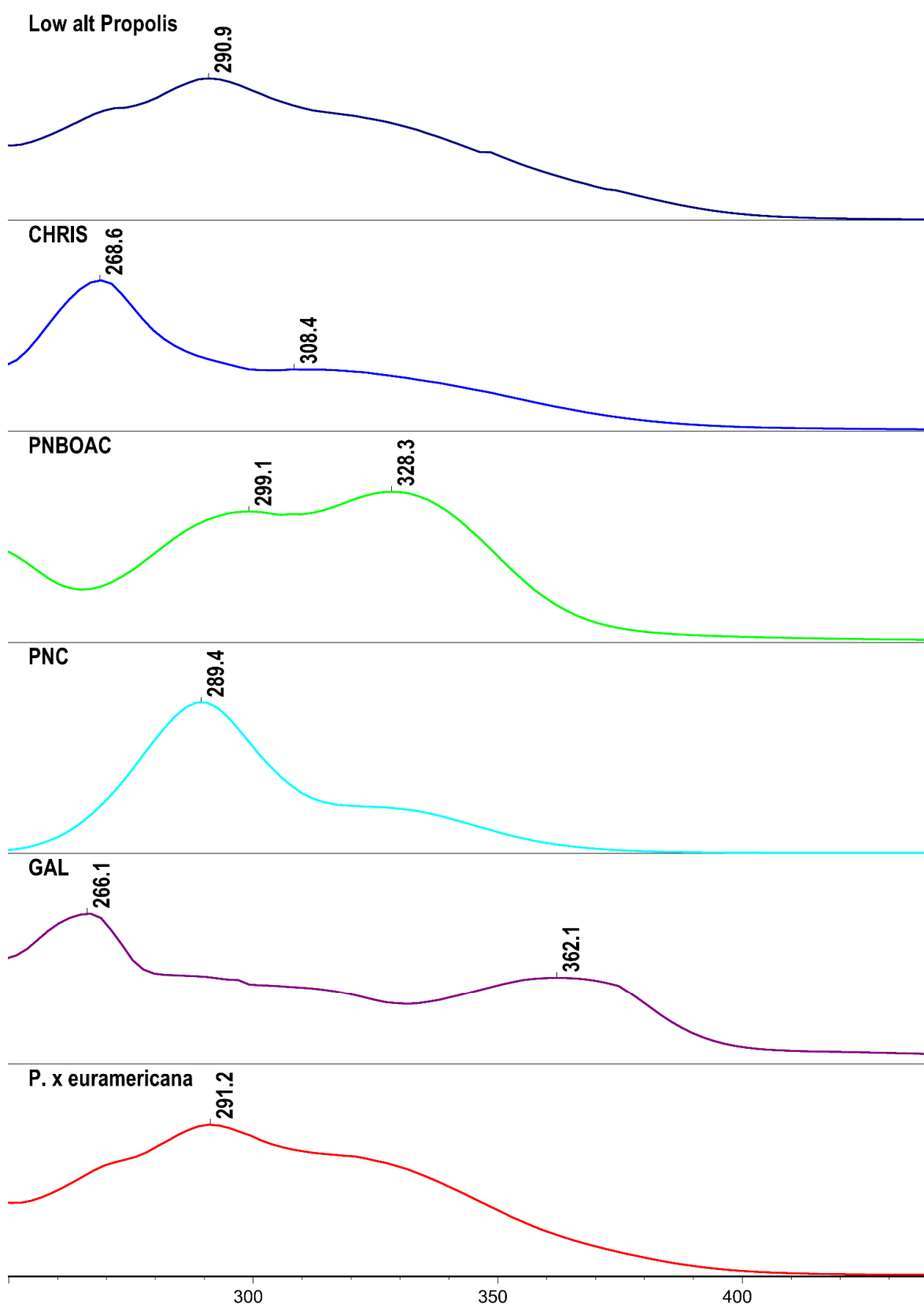
Prilog 33. Uporedni prikaz FTIR spektara ravničarskog propolisa tipa topola (BA 18) i dominantnih komponenti u njemu.



Prilog 34. Usporedni prikaz UV spektara planinskog propolisa tipa topola (BA 5), i dominantnih komponenti u njemu i smola sa pupuljaka *Populus tremula*.



Prilog 35. Uporedni prikaz UV spektara planinskog propolisa tipa topola (BA 18), i dominantnih komponenti u njemu i smola sa pupuljaka *Populus x euramericana*.



8 Biografija

Boban D. Anđelković je rođen u Kruševcu, 7. marta 1983. godine. Osnovnu i srednju Hemijsko-tehnološku školu završio je u Velikom Šiljegovcu. Školske 2002/2003. godine upisao je Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu na studijskoj grupi molekularna biologija i fiziologija. Diplomirao je marta 2009. godine sa prosečnom ocenom 8,11 u toku studija, i ocenom 10 na diplomskom radu, čime je stekao zvanje diplomirani molekularni biolog i fiziolog. Tema diplomskog rada bila je „Analiza sadržaja flavonoidnih jedinjenja iz propolisa”, mentor rada bila je prof. dr Svetlana Radović. Eksperimentalni deo diplomskog rada urađen je u na Katedri za organsku hemiju hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u grupi profesora dr Slobodana Milosavljevića.

Od 1. januara 2012. godine do 1. aprila iste godine bio je zaposlen kao istraživač-pripravnik na Institutu za krmno bilje u Kruševcu. Od 1. aprila 2012. godine do danas radi na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za organsku hemiju, kao stručni saradnik u NMR laboratoriji. Školske 2012/13.godine upisuje doktorske akademske studije na Hemijskom fakultetu pod mentortvom profesora dr Veleta Teševića. Od aprila 2015. godine bio je na šestomesečnom istraživačkom boravku na Verifin institutu, Univerziteta u Helsinkiju kao dobitnik prestižne stipendije Organizacije za zabranu hemijskog oružja (OPCW, Hag) za realizaciju projekta pod nazivom „Evaluation of biomedical sample analysis using NMR”.

Boban D. Anđelković je analitičar u akreditovanoj Laboratoriji za instrumentalnu analizu Centra za hemiju IHTM-a i Hemijskog fakulteta. Marta 2014. godine, kao analitičar laboratorije Centra za instrumentalnu analizu, učestvovao je na 35. testu izvrsnosti organizovanom od strane OPCW-a. Uspeh tima i laboratorije ocenjen je najvišom ocenom A.

Boban D. Anđelković učestvuje u realizaciji dva bilateralna međunarodna projekta sufinansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: „Metabolomic changes in fruits and vegetables affected by postharvest treatments” (Slovenija 2016/17.) i „The effect of heavy metals on the altering of

medicinal plant metabolism” (Crna Gora 2017/18.) Takođe učestvuje u realizaciji projekta saradnje Srpske akademije nauka i umetnosti i Bugarske akademije nauka „The secondary metabolites of wild-growing and cultivated plants with potential biological activity” (2015/18.).

Trenutno je angažovan i na međunarodnom naučno-istraživačkom projektu finansiranom od strane OPCW-a „Development of on-line GC-MS and LC-MS methods based on micro extraction inpacked sorbent (MEPS) for the OPCW proficiency testframework and on-site analysis” (2017/18.)

Koautor je trinaest naučnih radova publikovanih u međunarodnim naučnim časopisima (od čega sedam u vrhunskim međunarodnim časopisima kategorije M21, pet u istaknutim međunarodnim časopisima kategorije M22 i jedan u međunarodnom časopisu kategorije M23), i više saopštenja na naučnim skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja. Član je Srpskog hemijskog društva.

Spisak objavljenih i saopštenih radova koji su proistekli iz doktorske disertacije

Naučni radovi:

1. **Boban Anđelković**, Ljubodrag Vujisić, Ivan Vučković, Vele Tešević, Vlatka Vajs, Dejan Gođevac, Metabolomics study of Populus type propolis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2017) 135, 217-226 (**M21**)
2. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.12.003>
3. Jovana Žižić, Nenad Vuković, Milka Jadranin, **Boban Anđelković**, Vele Tešević, Miroslava Kacaniova, Slobodan Sukdolak, Snežana Marković, Chemical composition, cytotoxic and antioxidative activities of ethanolic extracts of propolis on HCT-116 cell line, *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2013) 93, 3001-3009 (**M21**)
4. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.6132/abstract>
5. Branislav Trudić, **Boban Anđelković**, Vele Tešević, Saša Orlović, Milka B. Jadranin, Gordana Krstić, Vladislava Galović, Hemijska analiza površinskog voska sa lišća klonova topola iz Srbije, Chemical analysis of leaf cuticular wax of poplar clones in Serbia, *Topola/Poplar* (2013) 191/192, 63-72 (**M52**)
<http://scindeks.ceon.rs/article.aspx?artid=0563-90341392063T>
6. Branislav Trudić, **Boban Anđelković**, Saša Orlović, Vele Tešević, Andrej Pilipović, Mirjana Cvetković, Jovana Stanković (2016) HPLC/MS-TOF Analysis of Surface Resins from Three Poplar Clones Grown in Serbia, *South-East European forestry* 7 (2): 129-133 (**nije kategorisan**)
<https://doi.org/10.15177/seefor.16-12>

Saopštenja:

1. Branislav Trudić, **Boban Anđelković**, Saša Orlović, Vele Tešević, Mirjana Cvetković, Jovana Stanković. Preliminary Biochemical Analysis of M1 (Panonnia) Poplar Clone Surface Resins, Proceedings of the Biennial International Symposium: FOREST AND SUSTAINABLE DEVELOPMENT, 24-25 of October 2014 Braşov, Rumunija (**M33**)
2. Dejan Gođevac, **Boban Anđelković**, Vlatka Vajs, Vele Tešević. The effects of altitude on the chemical composition of Populus type propolis. *PLANTA*

MEDICA (2016) 82(S 01): S1-S381(M34) <https://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0036-1596367>

3. **Boban Anđelković**, Dejan Gođevac, Ivana Sofrenić, Miroslav Novaković, Milka Jadranin, Ljubodrag Vujisić, Vele Tešević, UV-based spectroscopic differentiation of Propolis, 3rd International Conference on Natural Products Utilization, Bansko, Bulgaria, pp. 115 (Nagrada Fitohemijškog društva Evrope za najbolju prezentaciju)

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani Boban D. Anđelković
broj indeksa DH40/2012

Izjavljujem

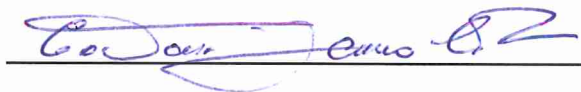
da je doktorska disertacija pod naslovom

**„Primena rezultata NMR i FTIR spektroskopskih tehnika u multivarijantnoj analizi
za klasifikaciju propolisa”**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 13.10.2017. godine

Potpis doktoranta



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autoa: Boban D. Anđelković

Broj indeksa: DH40/2012

Studijski program: doktor hemijskih nauka

Naslov rada „**Primena rezultata NMR i FTIR spektroskopskih tehnika u multivarijantnoj analizi za klasifikaciju propolisa**”

Mentori prof. dr Vele Tešević
 dr Dejan Gođevac

Potpisani Boban D. Anđelković

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci, vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezima, godina i mesto rođenja i datum odbrane doktorskog rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 13.10.2017. godine

Potpis doktoranta



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković” da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Primena rezultata NMR i FTIR spektroskopskih tehnika u multivarijantnoj analizi za klasifikaciju propolisa”

kao moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju, pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo

2. Autorstvo – nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poslednjoj strani).

U Beogradu, 13.10.2017. godine

Potpis doktoranta



1. Autorstvo – Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerade.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerade. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.