

Propolisul și extractele de propolis

CRISTINA MATEESCU*, I.F. DUMITRU**

** Institutul de Cercetare Dezvoltare pentru Apicultură, 42 Blvd. Ficusului,
71544 București 1, fax 01-2320287*

*** Centrul de Cercetări în Enzimologie, Genetică și Chimie Analitică,
Universitatea București, fax 01-4113171*

Introducere

Dezvoltarea societății umane a permis cunoașterea unor resurse naturale deosebit de valoroase – produsele albinelor. Mulți vindecători din antichitate au folosit mierea, polenul cules de albine, propolisul și lăptișorul de matcă, ceara de albine și veninul pentru tratarea unor boli.

În epoca modernă, studiile și cercetările efectuate asupra resurselor naturale capabile să asigure organismului uman echilibrul nutrițional și buna funcționare, au evidențiat valoarea biostimulentă, nutritivă și terapeutică a acestor valoroase produse. Între acestea, propolisul reprezintă la ora actuală una din cele mai puternice provocări pentru lumea nutriționiștilor și cea medicală.

Calitățile curative ale propolisului au fost cunoscute încă din vremea antichității. Produsul era foarte bine cunoscut în Egiptul antic. Cu câteva milenii înainte de Cristos, propolisul era cunoscut de marii preoți, singurii ce posedau cunoștințe de medicină și de chimie și chiar arta de îmbălsămare a cadavrelor.

Faptul că propolisul era cunoscut și de grecii antici este dovedit de însăși denumirea greacă a produsului : “pro” – înaintea , “polis” – cetate. Există o dovadă foarte veche ce face aluzie directă la propolis. Faimosul filosof grec Aristotel care dorea să cunoască îndeaproape activitatea albinelor a construit un stup transparent. Albinele nu au vrut însă să-și dezvăluiească “secretul” și au acoperit partea interioară a peretelui transparent cu o substanță de culoare închisă – probabil propolis.

Originea propolisului a fost obiectul unei polemici între doi scriitori romani – Plinius și Dioscoride. Primul credea că albinele recoltează propolisul din rășinile secretate de mugurii de salcie, de plop, de castan și de la alte plante, în timp ce cel de-al doilea afirma că acesta este recoltat din styrax. Mult mai târziu date despre propolis se regăsesc în lucrările lui Galenus și ale lui Varron.

În bine cunoscuta lucrare “Canonul științei medicale” Abu Ali Ibn Sina (Avicenna) vorbește de două tipuri de ceară: ceara pură și ceara neagră. În opinia sa, ceara pură este cea folosită la construcția pereților fagurilor în care albinele cresc puietul și depozitează mierea; ceara neagră este partea de debriuri din stup. Este foarte clar că ceara neagră nu este altceva decât propolisul.

Așadar, propolisul sau “cleiul de albine”, în stare naturală sau sub formă de extracte obținute prin aplicarea unor procedee blânde, reprezintă o sursă naturală deosebit de interesantă de produși cu acțiune biologică complexă și care, așa cum s-a demonstrat, prezintă o paletă deosebit de largă de acțiuni terapeutice, chiar în afecțiuni cu care se confruntă civilizația secolului nostru.

Pe plan internațional, studiile efectuate la nivelul unor cunoscute laboratoare de farmacologie și medicină au confirmat rolul deosebit pe care acest produs al stupului îl poate juca pentru organismul uman în profilaxia și tratamentul unor afecțiuni.

În acest sens, cunoașterea și folosirea empirică și conform tradiției medicinei populare a “cleiului de albine” a fost treptat înlocuită de studii științifice aprofundate care au confirmat nu numai complexitatea compoziției sale biochimice ci și efectele deosebite pe care le oferă acest produs natural în prevenirea și tratamentul unor afecțiuni degenerative, boli infecțioase, virale etc.

Descoperirea rolului esențial pe care îl deține echilibrul dintre factorii pro-oxidanți și sistemele antioxidante în viața organismelor aerobe în general și a omului în mod special – care trăiește într-un mediu deosebit de complex și expus unei palete largi de factori de agresiune – a condus la căutarea acelor resurse naturale capabile să asigure un aport cantitativ, dar mai ales calitativ, de compuși cu acțiune antioxidantă care să permită protejarea structurii vitale celulare – acidul deoxiribonucleic și întregul sistem de transmitere a informației genetice și membranele celulare. Prin marea afinitate a antioxidantilor față de radicalii liberi, acești compuși constituie ținta preferată a acțiunii oxidative, protejând astfel microstructurile celulare sau alți compuși esențiali.

În acest sens, propolisul, care s-a dovedit a fi o sursă extrem de interesantă din punct de vedere al compoziției sale în compuși cu acțiune antioxidantă - cu deosebite compuși flavonoizi – poate contribui sub formă de supliment în alimentație, la prevenirea la om a mortalității premature, prin corectarea deficitului din interacțiunile dintre antioxidanții endogeni.

În stare naturală sau sub formă de extracte, tincturi și diferite forme farmaceutice, propolisul reprezintă la ora actuală pe plan mondial unul dintre cele mai importante mijloace de studiu și de lucru pentru apiterapie.

Aplicarea apiterapiei este cunoscută, așa cum s-a amintit, din vremuri străvechi și astăzi, interesul pentru această variantă a medicinei naturale este din ce în ce mai larg în întreaga lume.

Prezenta lucrare se constituie într-o prezentare generală a compoziției biochimice complexe a propolisului și a extractelor sale precum și a câtorva dintre mecanismele de acțiune ale principalelor componente ale acestui produs natural la nivelul organismului uman.

I. Noțiuni generale despre propolis

1.1. Propolisul și rolul său în cadrul coloniei de albine

Cei ce nu cunosc prea multe despre albine, le asociază pe acestea adeseori numai producției de miere. Dar apicultorii știu foarte bine că albinele, pe lângă miere recoltează și polen, apă și propolis.

Este foarte probabil ca acesta să fie ultimul dintre aceste patru produse ale stupului cu care apicultorii au făcut cunoștință. Destul de des apicultorii își dau seama de existența propolisului când lucrează la stupi și observă că pe mâinile lor sau pe daltă se acumulează o substanță foarte lipicioasă. Această substanță este în general de culoare brun-roșcată și aderă puternic la piele. Pentru a îndepărta această substanță se folosește un solvent – de obicei alcool – dar benzina sau terebentina sunt la fel de eficiente.

Propolisul se găsește lipit (depus) în fisurile stupului, la capetele ramelor, în găurile din stup și chiar pe părțile cu suprafața netedă. În general, albinele nu folosesc propolisul pentru a umple spațiile superioare dar îl folosesc întotdeauna pentru a micșora dimensiunile urdinișului.

1.2. De ce recoltează albinele propolis ?

Propolisul poate fi folosit în stup în 5 scopuri. În primul rând el este utilizat la astuparea fantelor sau fisurilor din adăpostul ocupat de colonia de albine. În al doilea rând, în regiunile cu climat rece, propolisul este utilizat de către albine pentru reducerea urdinișului. Al treilea scop este acela de a face provizii pentru situațiile critice cum ar fi nevoia de a-l combina cu ceară pentru a îmbălsăma un oaspete nedorit care a murit în interiorul stupului și care a fost izolat ca într-un sarcofag pentru că acesta a fost prea mare sau prea greu pentru a fi evacuat. De multe ori apicultorii găsesc astfel de mumii care pot fi șoareci sau șopârle ucise și tratate astfel.

În al patrulea rând propolisul este utilizat de către albine pentru fixarea ramelor verticale la baza podișorului. În fine, în al cincilea rând și poate cel mai important din punct de vedere al proprietăților sale este acela de a acoperi fagurii noi și mai ales interiorul celulelor acestora cu o peliculă fină din această substanță. Cercetările au arătat că propolisul utilizat pentru aplicarea acestei pelicule poate fi constituit din substanțe asemănătoare diferitelor materii rășinoase obișnuite recoltate de pe mugurii plantelor și numai puțin modificate prin adăugarea de enzime secretate de glandele faringiene și mandibulare ale albinelor lucrătoare.

Película de sustanță aplicată de albine pe fagurii noi, pe pereții interiori ai celulelor precum și pe o mare parte din suprafața interioară a stupului, care adăpostește cuibul de puiet a fost denumită de P.W.PHILLIP (1928)[1] “**balsam**”. Unii cercetători consideră că pentru fabricarea “balsamului” albinele folosesc polenul ca sursă principală de materie primă.

1.3. Recoltarea propolisului de către albine

Recoltarea propolisului pare a fi rezervată unui număr restrâns de albine lucrătoare care prezintă o predispoziție genetică exclusivă. Din numărul total de albine al unei colonii numai câteva sunt angajate în această activitate iar acestea nu efectuează decât foarte rar alte activități cum ar fi colectarea de nectar și acest lucru nu se întâmplă de obicei chiar dacă el este foarte necesar coloniei.

Culegătoarele de propolis pot fi deturnate de la eforturile lor și angajate în recoltarea de nectar dacă în apropierea sursei de propolis există o sursă de nectar atractivă care conține o cantitate ridicată de zaharuri; în general însă, ele își reiau rapid activitatea de colectare de propolis. Culegătoarele de propolis sunt foarte rare mai în vârstă de 15 zile. Din acest punct de vedere ele se aseamănă celorlalte lucrătoare din stup.

1.4. Tendința de propolizare la câteva rase de albine

Cercetătorii care au studiat albina *Apis indica*, *Apis florea* și *Apis dorsata*, afirmă că acestea nu propolizează. Același lucru se afirmă și despre albina africană. În lucrarea sa intitulată “În căutarea celor mai bune sușe de albine: călătorii concludente”,[2] călugărul ADAM de la Mănăstirea St. Mary, Buckfast, South Devon, Anglia, arată că anumite rase de albine și în particular cele din zona Asiei Mici manifestă o tendință foarte puternică de propolizare.

De fapt, acesta vorbește de o albină galbenă frecvent întâlnită în regiunea munților Atlas și Sahara, cunoscută sub denumirea de *Apis sahariensis*. El presupune că această albină a fost adusă în Orientul Mijlociu de către evreii emigranți. Vorbind despre albina autohtonă din Anatolia Centrală în Asia Mică, unde iernile sunt foarte aspre, călugărul Adam spune că această albină, cunoscută sub denumirea de *Apis mellifera var. anatolica* utilizează propolisul pentru protecție la fel ca toate celelalte specii care fac acest lucru în zonele cu climat foarte aspru. Tot el este cel care spune că :”nu se poate spune că în Egipt albinele nu propolizează. La Fayum unde se cresc albine italiene, am văzut interiorul

stupilor căptușiți cu propolis din cel mai rășinos”. Se cunoaște de asemenea că albina gri caucaziană de munte are o tendință de propolizare mult mai pronunțată decât cea italiană.

1.5. Teorii asupra formării propolisului

La începuturile activității de creștere a albinelor, propolisul a fost în general identificat cu ceara. Mai târziu, cercetările asupra vieții albinelor au arătat că propolisul este un material de construcție și de protecție cu care albinele astupă orificiile din stup dar care are și alte calități. Aceasta este perioada în care au apărut întrebări asupra formării propolisului.

Primele teorii asupra formării și originii propolisului au fost foarte simple dar pe măsura obținerii de noi cunoștințe asupra vieții albinelor, acestea au fost respinse astăzi ele fiind doar etape parcurse până la stabilirea teoriilor actuale.

În prezent, există două teorii privitoare la originea propolisului.

O teorie afirmă că albinele recoltează propolisul din rășinile și secrețiile de pe mugurii și scoarța anumitor arbori din familia rășinoaselor și foioaselor din zona de amplasare a stupilor. Adepții acestei teorii afirmă că albinele colectează propolisul astfel: într-o primă etapă albinele desprind cu mandibulele o mică bucată de rășină sau de secreție pe care o tratează ulterior prin masticare la nivelul mandibulelor. Materialul astfel recoltat și prelucrat este transportat de picioarele anterioare și medii în corbiculele de polen aflate pe picioarele posterioare. Albinele formează deci niște pelote, în același mod ca și la polen. Apoi zboară spre stup unde alte albine le ajută să se debaraseze de aceste încărcături pe care le transportă în locurile în care ele sunt necesare. Principalii adepți ai acestei teorii sunt ROSCH, EVENIUS, BERLEPSCH, CIESELSKI și alții. Și întrucât ROSCH a fost cel ce a pus bazele acestei teorii, teoria este cunoscută sub denumirea de “teoria lui Rosch”. [3]

În 1907, o nouă teorie [4] a fost avansată de Dr.KUSTENMACHER care explică formarea și originea propolisului într-o altă manieră. Conform acestei teorii, propolisul provine din polen; albinele lucrătoare înghit polen și îl acumulează într-o porțiune din intestin denumită “chylus magen”, adică “stomac de polen”. Procesul propriu-zis de formare a propolisului începe prin absorbția unei mari cantități de apă. Grăuncioarele de polen suferă un proces de umflare datorită cantității de 5 ori mai mare de apă decât propria lor greutate și de dezintegrează. Din peretele grăuncioarelor de polen rezultă un balsam pe care albinele îl elimină

sub formă de picături cu diametrul de 2 până la 3 mm. Conform părerii Dr. Kustenmacher acest balsam constituie materia primă și esența propolisului.

Trebuie totuși remarcat faptul că nu toate grăuncioarele de polen sunt de aceeași calitate și o parte dintre acestea nu se dezintegrează ca urmare a umflării și din acest motiv ele reprezintă un balast în hrana albinelor, de care acestea încearcă să se debaraseze. Din cauza densității specifice mai reduse, acest balast de polen ajunge în partea posterioară a intestinului unde se combină cu balsamul. Prin mișcări de “unduire” ale “stomacului de polen”, albinele lucrătoare elimină această masă de balsam și grăuncioare de polen nedigerate pe care o depun pe pereții sau în crăpăturile stupului. Acolo, materialul capătă consistență formând o masă de culoare galbenă sau galben-roșiatică. Acestui material albinele îi adaugă – înainte de a se modifica – praf și impurități mecanice dând propolisului o consistență care permite transportul lui dintr-un loc în altul.

Deci, conform dr. KUSTENMACHER propolisul este format din balsamul provenit din părțile exterioare ale grăuncioarelor de polen pe care albinele îl amestecă cu ceară și alte materiale, impurități în cantități variabile.

Cunoștințele obținute în domeniul apiculturii de la apariția acestor teorii și până în prezent susțin dar și neagă anumite părți sau detalii ale acestora; de aceea este necesar să se facă o analiză critică asupra lor.

Dacă polenul este – conform teoriei dr. Kustenmacher – la baza formării propolisului ar trebui ca în acesta să se regăsească mai multe substanțe sub formă de compuși azotați, zaharuri și lipide pe care polenul le conține în cantități relativ mari. Rezultatele analizelor chimice nu confirmă câtuși de puțin aceasta teză. În plus, nici una din aceste substanțe conținute în polen nu a fost identificată în propolis. Multe aspecte fiziologice, morfologice, biologice și anatomice legate de propolis – expuse de HAYDAK, EVENIUS și ROSCH contrazic teoria lui KUSTENMACHER. [5]; [6]

În ultima vreme, cercetările efectuate asupra propolisului au furnizat numeroase date obiective în favoarea teoriei dr. ROSCH. Studiul compoziției chimice a propolisului au demonstrat clar că baza acestei teorii este mai realistă și mai bine fondată.

Conform acestei teorii se susține că mai ales substanțele identificate de o manieră indiscutabilă în propolis se regăsesc într-una sau mai multe specii de plante vizitate de albine și că secrețiile acestor plante pot fi sursa de producere a propolisului.

Un lucru deosebit de important pus în evidență este participarea activă a albinei la formarea propolisului. Prin secrețiile sale glandulare pe care le adaugă materiilor vegetale se obține propolisul recoltat de apicultor din stup.

Se demonstrează că majoritatea substanțelor de natură flavonoidă identificate și separate din propolis (GHISALBERTI, 1979) [7] se găsesc în stare liberă ca agliconi și nu ca glicoside, formă sub care acestea se găsesc în sursele vegetale. Se pare deci că albina dispune în secrețiile sale salivare de o substanță ce are capacitatea de a descompune glicosidele sau componentele lor principale pe care le transformă apoi în propolis și în hrană.

1.6. Surse naturale de propolis

Așa cum s-a menționat, componentele propolisului pot fi identificate în sursele vegetale vizitate de albine. Adeseori albinele vizitează plante din familia coniferelor, plop (*Populus sp.*) precum și alte specii: fagul (*Fagus sylvatica*), castan (*Aesculus hippocastanum*) pentru a colecta rășini de pe scoarța și mugurii acestor arbori.

În Europa, principalele surse de propolis cuprind: alunul (*Alnus spp.*), mesteacănul (*Betula spp.*), alunul de pădure (*Corylus spp.*), stejarul (*Quercus spp.*), plopul (*Populus spp.*) și salcia (*Salix spp.*).

În Statele Unite ale Americii, principalele specii sunt plopul și pinul (conifere).

Conform lucrărilor lui KONIG (1985) [8], mugurii de plop reprezintă principala sursă de propolis în Europa, America de Sud, Asia de Vest și Africa de Nord.

Între sursele secundare, același autor menționează: mesteacănul, stejarul, salcia și alunul, iar pentru alte zone geobotanice situația este următoarea:

- arborele *Acacia Karroo* în Africa de Sud
- *Xanthorrhoea pressii* și *Xanthorrhoea australis* în Australia și zonele de climat tropical
- Mugurii și scoarța arbuștilor *Plumeria accuminata*, *Plumeria acutifolia*, *Schinus terebinthifolius* și *Psidium guajava* în insulele Pacificului, îndeosebi în Hawaii

Studiile recente asupra originii botanice a propolisului din continentul sud american, mai ales din Brazilia au demonstrat prezența de compuși specifici unor plante ca: *Araucaria angustifolia*, *Eucalyptus globulus* și *Rosmarinus officinalis*.

1.7. Proprietăți fizice ale propolisului

Din punct de vedere **al aspectului**, propolisul se prezintă ca o masă heterogenă rășinoasă de **consistență** solidă, uneori compactă ceroasă provenind din particule maleabile și aderente, alteori granuloasă ori friabilă, luând aspectul unor sfărâmături pulverulente. Această masă ce prezintă o oarecare duritate la temperatura ambiantă devine friabilă la temperaturi scăzute, sub 15°C, chiar și pentru sorturile ceroase. La temperaturi ridicate se înmoaie și devine rășinos și lipicios, iar în intervalul de temperatură cuprins între 60 – 69°C sau după VELESCU și MARIN (1975), [9] 81 – 83°C. Așa cum s-a mai menționat, propolisul mai este cunoscut și sub denumirea de “clei de albine”.

Culoarea propolisului este însă deosebit de variabilă în funcție de sursă vegetală vizitată de albine. Conform studiilor efectuate de RICCIARDELLI D'ALBORE (1979)[10] pe eșantioane de propolis provenind din 5 continente, din diferite regiuni ale acestora a demonstrat că:

- propolisul din zonele cu climă temperată prezintă o gamă de culoare ce variază de la brun deschis la brun închis, uneori cu reflexe galben verzui;
- în Australia și în zonele cu climat tropical culoarea propolisului poate ajunge până la negru;
- propolisul din zonele apropiate de cercul polar (Finlanda) are o culoare portocalie
- propolisul cubanez prezintă mai multe varietăți: roșu, brun, verde și violet închis.
- propolisul brazilian are o culoare predominant verzuie cu nuanțe galben-brune.

Mirosul propolisului este foarte specific în general, complex, balsamic amintind ceara, mierea și vanilia. Și acest parametru este însă variabil în funcție de sursa de cules. Fumul pe care îl scoate la ardere poartă o aromă de balsamuri și rășini de cea mai fină calitate (HEGAZI, 1998) [11].

Greutatea specifică a propolisului variază mult: se citează valori cuprinse între 1,033 și 1,145.

Gustul este deasemenea un parametru specific dependent tot de sursa vegetală dar este în general iute, arzător.

Solubilitate - Propolisul este insolubil în apă și parțial solubil în alcool, acetonă, eter, cloroform, propilenglicol, benzen, dimetilsulfoxid, etilendiamină. În funcție de temperatură, variază nu numai viteza de dizolvare ci și trecerea în soluție sau nu a unor fracțiuni cum ar fi de exemplu ceara – care se dizolvă în alcool fierbinte, dar este greu solubilă în alcool la rece.

Reziduurile de la dizolvare cuprind în majoritate impurități și corpuri străine, alături de una sau mai multe dintre fracțiunile care rămân parțial solubile sau insolubile, în funcție de selectivitatea dizolventului.

Trecerea parțială într-un anumit solvent este luată în considerare atât la obținerea extractelor de propolis, cât și la stabilirea calității propolisului prin aprecierea substanțelor solubile, proporția acestora putând fi dată ca indice de control calitativ în farmaceutică. Conform părerii lui POPRAVKO (1975)[12], caracteristică este solubilitatea într-un amestec de cloroform + acetonă (2+1).

2. Compoziția chimică a propolisului

2.1. Compoziția generală a propolisului

În compoziția chimică a propolisului brut au fost semnalate în principal rășini, ceruri, uleiuri volatile, polen, glucide, aminoacizi, vitamine, enzime, săruri minerale și impurități.[7, 11]

Un tablou general de compoziție cantitativă prezintă următoarele concentrații ale grupelor majore de substanțe:

- 55% rășini și balsamuri (balsamurile sunt definite ca substanțe naturale lichide sau semi-lichide obținute de obicei prin metode speciale din scoarța unor arbori – OPRIS, 1990) [13]
- 7,5 – 35% ceruri de natură vegetală cu solubilități diferite și ceară de albine (cerurile sunt întotdeauna prezente în compoziția propolisului)
- 10% uleiuri volatile (esențiale) sunt compuși caracterizați de obicei prin prezența unor arome specifice
- 5% polen
- 5% acizi grași
- 4,40 – 19% impurități
- terpene
- vitamine: A, B, E, PP
- oligoelemente: aluminiu, argint, crom, cobalt, fier, magneziu, etc.
- aminoacizi liberi: prolină și arginină
- substanțe taninice, secreții ale glandelor salivare de la albine și componente prezente în mod accidental în propolis (așchii de lemn, fragmente de corp de albină etc.

În propolis se poate găsi un număr foarte mare de compuși. În 1990 GREENAWAY et al., [14] a constatat că în timp ce exudatele de pe mugurii diferitelor specii de plop sunt frecvent asemănătoare din punct de vedere al compoziției calitative, acestea pot fi foarte diferite din punct de vedere cantitativ, diferențe ce se regăsesc la nivelul compoziției propolisului în care este incorporat exudatul respectiv. Aceste variații cantitative pot fi uneori considerabile.

2.2. Compoziția calitativă a propolisului

Se poate afirma că în general, orice compus identificat în exudatele vegetale pe care le colectează albinele, poate fi regăsit în propolis.

Cea mai mare parte a componentelor prezente în exudatele vegetale sunt incorporate în propolis fără a fi alterate, deși este posibil ca unele glicozide să fie supuse unei hidrolize enzimatică efectuată de albine prin secrețiile lor salivare în timpul colectării exudatelor sau în cursul adăugării de ceară pentru obținerea propolisului.

Conform autoarelor WALKER și CRANE (1987) [15], compușii individuali sunt prezenți în unul sau mai multe eșantioane de propolis care provin de la una sau mai multe specii vegetale; unii compuși sunt probabil prezenți în toate eșantioanele de propolis și contribuie la proprietățile sale caracteristice; unii compuși pot fi prezenți în multe eșantioane de propolis de origini diferite, dar alții aproape sigur sunt prezenți numai în propolisul recoltat dintr-o anumită specie vegetală.

Studiile de spectroscopie în infra-roșu au relevat prezența în diferitele sorturi de propolis a următoarelor grupuri de radicali organici (MAKASHVILI, 1978) [16]:

- legături duble C-C
- gruparea CH a nucleului furanic
- gruparea carbonil
- gruparea CH₂-O-CH₂
- grupul furan
- gruparea ariloxi în compuși ce conțin gruparea metoxi
- grupurile – (CH₃)₂C și –(CH₃)₃C
- gruparea =C-OH
- sisteme ciclice aromatice
- sisteme aromatice
- gruparea delta-lactonă a butandienolilor
- grupări CH₃ și CH₂
- gruparea CH aromatică
- grupări OH asociate hidrogenului molecular
- monooxiflavone care nu conțin grupări OH în pozițiile C3 și C5
- inele piranice cu C, H beta (antrachinone cu 3 grupări alfa)

2.3. Principalele grupe de substanțe izolate din propolis

Constituenții farmacologic activi din propolis se găsesc în fracțiunile solubile în diferiți solvenți organici, cum este cazul alcoolului etilic – principalul solvent utilizat la obținerea de extracte de uz farmaceutic.

Cei mai importanți sunt flavonoizii în grupa cărora intra flavonele, flavonolii și flavanonele precum și diferiți compuși fenolici și aromatici.

Din punct de vedere biochimic flavonoizii sunt derivați ai benzo-gamma-piranului prezenți în toate celulele vegetale apte de fotosinteză. Localizați în membrana tilacoidă a cloroplastelor, această grupă de compuși participă în calitate de catalizatori în lanțul transportor de electroni în faza luminoasă a fotosintezei și/sau ca reglatori ai canalelor ionice implicate în procesele de fosforilare. Acest lucru are o semnificație deosebită din punct de vedere al activității lor chimice. Larg reprezentați în regnul vegetal, până în prezent au fost recenzați peste 100 de reprezentanți.

Când celulele vegetale mor, flavonoizii sunt “deversați” în sucurile, sevele, rășinile și chiar în nectarul recoltat de insecte (un astfel de exemplu este pinocembrina incorporată în miere care contribuie la activitatea antibacteriană a acesteia).

Produsele lor de degradare sunt în mare măsură responsabile de colorarea frunzelor copacilor toamna.

Tabel nr.1

Flavonoizi din propolis

Denumirea comună	Denumirea biochimică
<u>Flavone</u>	
Crizină	5,7-dihidroxi flavonă
Tectocrizină	5-hidroxi-7-metoxi flavonă
Galangină	3,5,7-trihidroxi flavonă
Galangin-3-metil eter	5,7-dihidroxi-3-metoxi flavonă
Acacetină	5,7-dihidroxi-4'-metoxi flavonă
Isalpinină	3,5-dihidroxi-7-metoxi flavonă
Kaempferol	3,5,7,4'-tetrahidroxi flavonă
Luteolină	5,7,3',4'-tetrahidroxi flavonă
Kaempferidă (kaempferol-kaempferol-7,4'-dimetil eter)	
Rhamnocitrină	3,4',5-trihidroxi-7-metoxi flavonă
Ermanină	5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxi flavonă
Pectolinarigenină	5,7-dihidroxi-4',6'-dimetoxi flavonă
Quercetină	3,5,7,3',4'-pentahidroxi flavonă
Quercetin-3,3-dimetil eter	
Quercetin-3,7-dimetil eter	
Betuleol	
Apigenină	5,7,4'-trihidroxi flavonă
Apigenin-7-metil eter	
Rhamnază	
Rhamnetină	
Isorhamnetină	
Alnusină	
Fisetină	
<u>Flavanone</u>	
Alpinetină	
Alnustinol	
Pinocembrină	
Pinostrobină	
Pinobanksină	
3-acetil-pinobanksină	
pinobanksin-3-butirat	
pinobanksin-3-hexanoate	
pinobanksin-3-metil eter	
sakuranetină	
isosakuranetină	5,7-dihidroxi-4'-metoxi flavanonă
naringenină	5,7,4'-trihidroxi flavanonă

Conform studiilor lui PAPAY și col., (1985)[17] și DONADIEU (1994) [18] flavonoizii din propolis pot fi clasati în:

Flavone:

- acacetină
- crizină
- tectocrizină
- apigenină
- pectolinarigenină etc.

Flavonoli:

- galangină
- galangin-3-metil eter
- isalpinină
- kaempferidă
- kaempferol
- quercetină
- quercetin-3,3-dimetileter
- rhamnocitrină
- rhamnetină
- isorhamnetină

Flavonone:

- pinostrobină
- sakuranetină

Flavononoli:

- pinobanksină etc.

Datele din care rezultă că flavonoidele din propolis sunt bine reprezentate cantitativ, iar sub acest aspect ele capătă importanța unor componente principale, cu proporții de 15-20%, au fost publicate abia recent (POLINICENCU și col., 1981)[19]. Astfel de concentrații flavonoidice au fost determinate de autori și în mostre reprezentative de propolis din Ungaria și Uruguay.

Crizina sau 5,7-dihidroxi flavona sau 5,7-dihidroxi-2-fenilcromona a fost fost descoperită în 1927 de G.T.JAUBERT[20] atât în propolis cât și în mugurii de plop, ea fiind prezentă, de asemenea, în miere și în ceară. Cu toate că nu este singurul flavonoid de culoare galbenă din amestecul prezent în propolis, ceară, miere – fiind din punct de vedere cantitativ componenta majoritară – a fost la începuturi singura semnalată și astfel culoarea galbenă a cerii de albine și a mierii se atribuia numai crizinei.

Tectocrizina sau tectogenina, a cărei prezență în propolis a fost semnalată de G.T.JAUBERT [20] este 7-metil-eterul crizinei. În studiile ulterioare efectuate

asupra acestui compus au demonstrat proprietățile sale diuretice, pentru care s-a eliberat un brevet de invenție SUA din 1964, al firmei Laroche Navarron, autor PERRAULT (1976) [21].

Galangina este flavonolul crizinei, adică 3-hidroxicrizina. Concentrația sa în propolis o plasează alături de crizină, între bioflavonoizii bine reprezentați cantitativ. Ea a fost evidențiată de VILLANUEVA și col., (1964) [22] iar în mugurii de plop – diferite specii – de EGGER și col., (1969) [23].

Izalpinina a fost prima dată evidențiată în propolis de VILLANUEVA și col., în 1964 [22].

Pinocembrina își datorează numele descoperirii sale în mugurii speciei *Pinus cembra* (Pinaceae) de către ERDTMAN (1946)[24]. Ca și crizina, pinocembrina este prezentă între componentele rășinii de pe mugurii de plop. Ca structură este flavanona corespunzătoare crizinei.

Pinostrobină, descoperită în 1946 în mugurii speciei *Pinus strobus* apoi separată și din specia *Prunus avium* (Rosaceae).

Pinobanksina este 3-hidroxi-pinocembrina, adică un flavanonol din seria flavonoidelor specifice din propolis, caracterizate prin lipsa oricărei funcțiuni fenolice pe inelul B. A fost descoperită în compoziția unor specii de *Pinus* între care *Pinus banksiana*. Abia în 1979, SCHNEIDEWIND și col.,[25] o citează în propolis.

3-acetatul de pinobanksină este la rândul său identificat în totalul flavonoidic al propolisului și pare să nu fi fost identificat în vreo plantă.

Există opinia conform căreia principiile active cel mai bine reprezentate cantitativ și întotdeauna prezente în propolis, implicit susceptibile de a da cele mai constante și mai caracteristice efecte farmacologice ale acestui produs, sunt bioflavonoidele care au ca particularități de structură starea liberă, de compuși de neglicozidați, precum și lipsa vreunei funcții fenolice în inelul B.

Este poate important de menționat faptul că toate aceste componente menționate, fără excepție, se regăsesc în compoziția chimică a multor specii de *Pinus*, răspândite în cele mai îndepărtate și variate regiuni de pe glob și mai ales în mugurii de pin, la rândul lor utilizați pretutindeni pentru proprietăți terapeutice bine cunoscute. Pe de altă parte, este cunoscută și utilizarea rășinii unor muguri, ca cei ai speciilor *Populus*, *Prunus*, ca materie primă pe care albinele o asociază unor ceruri și altor componente, la elaborarea propolisului. Este de asemenea adăugat că și mugurii de plop sunt medicinali și împreună cu mugurii de prun și de *Zingiberaceae* sunt depozite de astfel de bioflavonoizi.

Alți compuși flavonoidici prezenți în propolis în cantități mai mici sunt:

- acacetina sau linarigenina izolată de POPRAVKO (1975) [12];
- 7-metil-eterul-acacetinei, separat din mugurii de *Betula verrucosa*;

- campferida – izomer de poziție al rhamnocitrinei identificată de POPRAVKO (1969) [26];
- pectolinarigenina sau 6-metoxi-acacetina sau 6-metoxi-linarigenina,
- 4'-metil-eterul-sakuranetinei – o flavanonă a cărei origine și structură se află în pinostrobină de la care derivă prin metoxilare a fost semnalată în propolis de către METZNER și col., (1975) [27].

Toate aceste flavonoide semnalate frecvent în propolis sunt prezente sub formă de agliconi și care au ca specificitate – prezența de funcțiuni fenolice libere, reactive, grefate pe inelul B.

Quercetina (quercetina) – agliconul rutozidei și al mai multor alte glicozide flavonoidice este foarte răspândită în regnul vegetal. A fost descoperită în stare pură de PERKIN și HUMMEL în 1896 [28] în hamei *Humulus lupulus* și în cojile de ceapă (*Allium cepa*). Este utilizată în terapie, alături de alte bioflavonoide, ca substanță activă pentru menținerea stării normale a vaselor sanguine prin descreșterea permeabilității și fragilității capilarelor BUDAVARI (1989) [29]

Alte grupe de compuși prezente în propolis sunt **chalconele și dehidrochalconele, acizi alifatici și esterii lor, uleiuri volatile cu catenă scurtă și esterii ai acestora, acizi aromatici și esterii ai acestora, acid benzoic și derivații ai acestuia, aldehide, alcooli, acid cinnamic și derivații acestora, alți acizi și derivați, cetone, fenoli și compuși heteroaromatici, terpene, alcooli sesquiterpenici și derivații ai acestora, terpenoizi și alți compuși, hidrocarburi sesquiterpenice și triterpenice, compuși volatili, hidrocarburi (C21-C33), hidrocarburi alifactice, steroli și hidrocarburi steroidice, zaharuri, lactone, aminoacizi, derivați de acizi nucleici, vitamine, minerale, transhidrogenaze anaerobe, substanțe donoare de H.**

Între **chalcone și dehidrochalcone** GREENAWAY și col.,(1990) [14] se pot menționa:

- chalcona alpinetinei
- chalcona pinostrobinei
- chalcona pinocembrinei
- chalcona pinobanksin-3-acetatului
- chalcona sakuranetinei
- 2',6' -dihidroxi-4'-metoxi dihidrochalcona

Acizi alifatici și esterii ai acestora (GREENAWAY și col., 1990) [14]:

- acid butiric, 2-metoxi-butiric, succinic, crotonic, angelic,, fumaric, behenic, acetic, benzil-acetat, izobutil-acetat, izopentil-acetat, izopentenil-acetat,
- acid palmitic, cerotic, montanic, stearic, oleic, linoleic, miristic, lignoceric,

Uleiuri volatile cu catenă scurtă:

- acid butiric, acid 2-metil-butiric
- acid crotonic
- acid angelic
- acid acetic
- acid izobutiric

Esteri ai uleiurilor volatile cu catenă scurtă:

- izobutil-acetat
- izopentil- acetat
- izopentenil-acetat

Acizi aromatici și esterii ai acestora:

- acid benzoic
- benzil-benzoat
- acid protocatehic
- acid veratric
- etil-benzoat
- metil-salicilat
- benzil-salicilat
- acid hidroxibenzoic
- acid vanilic
- acid p-anisic
- metil-benzoat
- cinnamil-benzoat
- acid hidroxicinnamic
- acid cinnamic
- acid metoxicinnamic
- acid p-metoxicinnamic
- acid 3,4-dimetoxicinnamic
- benzil-3,4-dimetoxi-cinnamat
- acid caffeic și esterii
- acid cumaric, acid p-cumaric și esterii ai acestora
- acid ferulic, acid izoferulic și esterii ai acestora
- derivați ai acidului benzoic: acid salicilic, acid gentisic, protocatehic, acid galic

Aldehyde:

- benzaldehidă
- aldehidă protocatehică
- p-hidroxibenzaldehidă
- vanilină
- izovanilină
- aldehidă caproică

Alcooli:

- alcool cinnamic
- alcool benzilic
- hidrochinonă
- alcool prenalic
- izobutenol
- alcool fenetic
- alfa-glicerofosfat
- beta-glicerofosfat
- glicerol

Alți acizi și derivați ai acestora:

- esterul metilic al acidului 2,8-dimetilundecanoic
- esterul fenilmetilic al acidului 14-metilpentadecanoic
- esterul etilic al acidului palmitic
- acid sorbic
- esterul butil-2-metilpropilic al acidului ftalic
- metil esterul acidului alnustic

Cetone, fenoli și compuși heteroaromatici:

- acetofenonă și derivați
- p-acetofenol și derivați
- eugenol
- pterostilben
- xanthorrhoeol
- cumarină
- esculetol
- scopoletol
- pinosilvină
- trigliceride fenolice

Alcoolii terpenici, sesquiterpenici și derivați:

- geraniol
- nerolidol
- guaial
- farnesol
- dihidroeuodesmol
- beta-bisabolol
- alfa-acetoxibetulenol

Terpenoide și alți compuși:

- cimen
- limonen
- alfa-copaen
- stiren
- 1,8-cineol

Hidrocarburi sesquiterpenice și triterpenice:

- beta-burbonen
- cariofilen
- patchoulen
- selen etc.

Hidrocarburi alifatice:

- eicosan, eicosină, heneicosan
- 1-octadecen
- tricosan
- pentacosan

Steroli și hidrocarburi steroidice:

- cholestrilen
- cholinasterol
- stigmasterol
- beta-dihidrofucosterol
- lanosterol
- colesterol

Zaharuri:

- d-ribofuranoză
- d-fructoză
- d-glucitol

- d-guloză
- taloză
- zaharoză
- d-glucoză
- polizaharide

Aminoacizii determinați cantitativ 16 (KARDAKOV, 1980) [30] sau 24 (GABRYS, 1986) [31] au ca reprezentanți semnificativi acidul piroglutamic, arginina și prolina. Proveniența acestora în propolis este pusă atât pe seama polenului dar și a secrețiilor salivare ale albinelor.

Același lucru se poate afirma și despre prezența **vitaminelor** cu reprezentanți: B1, B2, B6, C, E, acid nicotinic, acid pantotenic, vitamina A.

Elementele minerale sunt determinate din reziduul obținut după calcinarea propolisului. În diferite eşantioane de propolis provenind din diferite regiuni ale globului, VANHAELEN și VANHAELEN-FRASTRE (1979) [32] au determinat următoarele proporții: 0,51-0,86% în mostre din Franța, 0,55% - China, 0,67% - SUA, 0,68%- Australia.

Principalii reprezentanți ai acestora sunt: sodiul (Na), potasiul (K), magneziu (Mg), calciul (Ca), bariu (Ba), bor (B) – urme, stronțiu (Sr), zinc (Zn), cadmiu (Cd), aluminiu (Al), siliciu (Si), plumb (Pb), - urme (datorate mai ales poluării din traficul rutier sau prin amplasarea stupinelor în aceste zone sau zone industriale), seleniu (Se) – urme, fer (Fe), nichel (Ni), crom (Cr), mangan (Mn), titan (Ti), argint (Ag), cupru (Cu), cobalt (Co), molibden (Mo), vanadiu (V).

Substanțele rășinoase. Deși în datele curente de specialitate nu sunt informații foarte clare despre izolarea fracțiunii rășinoase din propolis și caracterizarea ei, prezența rășinilor nu este pusă la îndoială de nimeni. Multe dintre proprietățile propolisului se pot raporta la conținutul mare de rășini. Se citează și prezența unor acizi rezinici, ca acidul abietic și acidul pimaric care fac parte din constituenții cei mai caracteristici ai rășinilor naturale.

Alte componente amintite deja, frecvent întâlnite în rășini, ca acidul benzoic, acidul cinamic, acidul ferulic, acidul cafeic, cumarine și triterpenoide pentaciclice au fost identificate în propolis. Acidul benzoic atinge 1,33-20% (BRĂILEANU și col., 1978)[33] și alături de acidul cinamic este una dintre substanțele cele mai caracteristice din rășina de *Styrax benzoin* de la care își trage numele, fiind totodată o componentă comună a mai tuturor rășinilor de pe muguri, ca și acizii ferulic și cafeic.

Cercetarea esterilor aromatici din propolis de tipul celor citați anterior și chiar mai complicați ca structură (prin identificarea unor acizi polifenolici esterificați) a condus la descoperirea deosebit de valoroaselor proprietăți

antimicrobiene ale propolisului, prin prezența sau absența lor, putând fi explicată inconsecvența de activitate antimicrobiană a diferitelor sorturi de propolis (METZNER și col., 1975, 1977, 1978) [27, 34, 35].

Din punct de vedere cantitativ, fracțiunea rășinoasă se consideră că reprezintă cca. 55% din propolis, cu mențiunea cuprinderii în această fracțiune și a unor balsamuri. Se știe că balsamurile se definesc ca amestecuri de rășini și uleiuri volatile (esențiale) în care ultimele, ca regulă generală, trebuie să fie în proporție de cel puțin 40%. Este posibil ca numai mirosul balsamic al propolisului să fi generat această exprimare deoarece studiile efectuate nu au relevat prezența de uleiuri volatile în astfel de proporții.

3. Extracte de propolis – tehnologii de obținere a extractelor standardizate

3.1. Tehnologia prelucrării propolisului

Așa cum se poate observa din prezentarea compoziției chimice a propolisului, principalele grupe de componente ale propolisului brut, în ordinea descrescândă a concentrațiilor, sunt: substanțele rășinoase, ceara, bioflavonoizii, impuritățile și corpurile străine, sărurile minerale, vitaminele, enzimele etc.

Fiind un amestec atât de complex, primele încercări de caracterizare a acestuia au avut ca scop fracționarea sa.

Urmare a extracției alcoolice se obține așa numita “fracțiune rezinică”. După extracție rămâne fracțiunea insolubilă în alcool sau fracțiunea de ceruri.

Fracțiunea cunoscută sub denumirea de “balsam” se referă la componentele ce pot fi extrase cu alcool de concentrație 70%.

Propolisul brut este supus mărunțirii la dimensiuni a particulelor cât mai mici pentru a se putea mări suprafața de contact a solventului cu materialul extractibil. Pentru a facilita mărunțirea, dar și pentru a păstra cât mai bine fracțiunea volatilă de compuși, propolisul este păstrat la temperaturi foarte scăzute – chiar congelat după care este măcinat (devenind friabil). În instalații speciale – specifice industriei farmaceutice – instalații de extracție – percolatoare, produsul este supus extracției cu alcool etilic absolut la temperatura ambientală. Alcoolul etilic absolut prezintă avantajul unei foarte bune selectivități . extrăgând cel mai bine flavonoidele și substanțele rășinoase, eliminând din extract ceara. Prin acest procedeu se obține totuși o mică fracțiune de ceară, solubilă în alcool, respectiv ceroleina, care însă în propolis nu este prezentă decât în cantități de 0,78 – 1,63% (POLINICENCU și col., 1981, 1984) [19, 36].

Capacitatea extractivă a etanolului absolut este secondată de alcoolul etilic de 70°, acetonă, metanol, alcool etilic de 50°, cloroform și clorura de metilen.

Tehnologia de preparare prin aplicarea acestei metode urmărește realizarea a două variante : un extract fluid cu conținut de 10% bioflavonoide exprimate în crizină și un extract uscat cu conținut de 5% bioflavonoide exprimate în crizină (POPESCU și col., 1985) [37].

Prepararea extractului de propolis fluid standardizat cu 10% bioflavonoide exprimate în crizină – tehnologie I.C.C.F-Cluj-Napoca

În principiu procedeul de preparare a EPS fluid se bazează pe obținerea unei soluții extractive din propolisul brut, concentrarea acestei soluții sub presiune scăzută, la temperaturi mai mici de 50°C și standardizarea extractului obținut la concentrația de 10% bioflavonoide exprimate în crizină.

Un detaliu important în obținerea EPS fluid este calitatea propolisului brut luat în lucru: propolisul trebuie să fie de uz medicinal – caracterizat deci prin lipsa corpurilor străine (impurități) vizibile cu ochiul liber și printr-un conținut minim de 15% bioflavonoide specifice.

Cercetările efectuate au demonstrat necesitatea combinării a două procedee exxtractive: macerarea repetată și percolarea. Utilizând numai macerarea repetată, extracția principiilor active din propolis nu este cantitativă. La aplicarea combinată a percolării se obține extragerea cantitativă a principiilor active, operația însă decurgând foarte încet datorită conținutului ridicat de substanțe rășinoase din propolis și a colmatării filtrelor. Deaceia aplicarea preliminară de macerări repetate și apoi a percolării conduc la cele mai bune rezultate.

În vederea extracției, propolisul brut trebuie mărunțit la finețea sitei cu latura ochiurilor de 6,3 mm (sita I, FR.IX.). Mărunțirea se realizează cu ajutorul unor dispozitive mecanice de tăiere și răzuire. Deoarece în timpul acestei operațiuni propolisul se încălzește și devine plastic, se recomandă înghețarea (răcirea) propolisului brut prin menținerea 6 – 12 ore la temperaturi cuprinse între 10 – 20°C, când acesta devine casant, iar operațiunea se desfășoară cu mai multă ușurință.

Propolisul mărunțit se supune la trei macerări repetate, fiecare a câte 24 ore, într-o primă etapă utilizându-se o cantitate dublă de alcool concentrat față de cantitatea de propolis luată în lucru, apoi încă de două ori cu o cantitate egală de alcool față de cantitatea inițială de propolis. În timpul macerării, soluția se agită ocazional. Soluțiile extractive obținute se decantează, se filtrează și se reunesc.

Materia primă extrasă parțial prin macerare repetată, este supusă, în continuare, extracției prin percolare. Reziduul de la macerarea repetată se introduce în percolator, se acoperă cu alcool, se elimină aerul și se reglează astfel viteza de curgere a percolatului, încât în 24 de ore să se percoleze 1,5 părți față de cantitatea

de propolis introdusă în percolator. Se continuă percolarea până la epuizarea propolisului, respectiv până la obținerea unui lichid de culoare slab gălbuie, cu indici de refracție cuprinși între 1,3720 – 1,3655. Soluția extractivă obținută prin percolare se colectează separat de soluția extractivă obținută prin macerare repetată.

Faza următoare cuprinde determinarea concentrațiilor de bioflavonoide ale celor două soluții extractive obținute prin macerare repetată și respectiv prin percolare, stabilindu-se volumul aproximativ la care trebuie concentrate pentru a realiza extractul fluid cu conținutul standard de 10% bioflavonoide specifice.

Concentrarea soluțiilor se face la presiuni reduse și temperaturi care să nu depășească 50°C. Cele două concentrate obținute se omogenizează, se determină conținutul de bioflavonoide și se aduce extractul fluid la concentrația finală de 10% bioflavonoide exprimate în crizină. (**Figura 1**)

Alcoolul etilic concentrat, recuperat prin distilare, se poate utiliza la o nouă extracție.

Prepararea EPS uscat cu 5% bioflavonoide exprimate în crizină (tehnologie ICCF- Cluj Napoca)

Obținerea EPS uscat se face pornind de la EPS fluid; acesta se adsoarbe pe o pulbere inertă, se usucă, se pulverizează și se aduce la concentrația de 5% bioflavonoide specifice. Dintr-o parte EPS fluid se obține 2 părți EPS uscat.

Procedul de preparare este următorul: se amestecă 1 parte EPS fluid cu 1,5 părți pulbere adsorbantă (amidon). Amestecul obținut se întinde pe tăvi și se usucă la temperaturi sub 50°C, iar dacă este posibil și la presiune redusă. Extractul uscat obținut se pulverizează, se omogenizează, se face determinarea cantitativă a flavonoidelor și se aduce la concentrația de 5% principii active exprimate în crizină, adăugându-se pulbere adsorbantă. Extractul uscat se reomogenizează și se aduce în final la finețea sitei cu laturile ochiurilor de 250μ (sita VI, FR.IX).

Tehnologia de obținere a extractului moale (spiss) de propolis pentru uz farmaceutic (tehnologie originală ICDA-București) (PALOȘ și col., 1975) [38]

Toate produsele cu destinație terapeutică pe bază de propolis realizate pentru prima oară în lume în România, folosesc ca materie primă activă extractul de propolis spiss (moale). Prin extract moale (spiss) de propolis se înțelege preparatul obținut prin extracția selectivă a principiilor active din propolis cu ajutorul alcoolului etilic utilizat ca solvent și concentrarea soluției extractive obținute până la realizarea unei mase vâscoase care prezintă cel mult 20% solvenți.

Procesul tehnologic de fabricație a extractului de propolis spiss cuprinde următoarele etape:

- **selectarea propolisului** (acesta nu trebuie să conțină un procent ridicat de ceară, impurități sau semne de degradare);
- **mărunțirea blocurilor de propolis** până la o granulare de 2-4 mm care permite creșterea suprafeței de contact cu solventul facilitând extracția. Mărunțirea propolisului este o operație foarte dificilă având în vedere consistența sa dură, lipicioasă, care face ca echipamentele folosite în mod obișnuit în acest scop să nu dea rezultate pozitive. Procesul de mărunțire se face în două etape: mărunțirea blocurilor de propolis până la dimensiuni de 20-30 mm, după care granulele mari sunt aduse la dimensiunea de 3-4 mm. Pentru prima operațiune se folosește o presă mecanică de 150 kg/cm² la care se adaptează ștanțe cu cuțite din oțel foarte dur. Pentru faza a doua se folosește o moară cu cuțite prevăzută cu un tambur robust, mobil, pe care sunt fixate cuțitele și care în timpul rotirii tamburului trec printre cuțitele unei plăci fixe.
- **Macerarea:** extracția principiilor active din propolis se realizează cu alcool etilic de 90° în șarje formate din 70 litri alcool și 30 kg propolis în granule. Materiile prime se introduc într-un extractor din inox cu pereți dubli prin care circulă apă caldă la temperatura de 40°C. masa este agitată mecanic cu un agitator de turație mică (1 rpm); folosirea agitării și a temperaturii moderate accelerează și îmbunătățește procesul de extracție; după 48 ore se obține o cantitate de 75-80 kg extract fluid de propolis care este supus filtrării;
- **Filtrarea** se execută în scopul separării reziduurilor nedizolvate. Într-o primă fază se aplică o decantare, apoi filtrare grosieră printr-un filtru de vid tip nuce și în final o filtrare fină prin hârtie de filtru la aparat prevăzut cu pompă de vid.
- **Concentrarea** extractului constă în reducerea cantității de solvent până la limita de 20% și recuperarea acestuia cu ajutorul unui aparat de concentrare la vid. Aparatul este format dintr-un blaz de distilare, din tablă de inox, cu pereți dubli prin care circulă apă încălzită la temperatura de 70-80°C. evaporarea la vid și încălzirea moderată asigură conservarea principiilor active ale propolisului în condițiile unei concentrări rapide. Vaporii de solvent trec din blazul de distilare într-un condensor format dintr-o serpentină cufundată în apă rece cu circulație continuă; condensatul recuperat se colectează într-un vas special la care este conectată pompa de vid.
- **Verificarea calității** produsului se face prin determinarea densității care este cuprinsă între 1,096 - 1,159, identificarea flavonelor conform specificațiilor din farmacopee și identificarea acizilor aromați. Extractul de propolis spiss este caracterizat din punct de vedere calitativ și cantitativ prin determinarea concentrației în flavonoizi totali exprimați în quercetină, procedeu aprobat de Agenția Națională a Medicamentului.

Tehnologia de obținere a extractului de propolis hidrosolubil liofilizat – procedeu original brevetat la ICD Apicultură – București

Extractul de propolis moale (spiss) este folosit ca materie primă pentru obținerea extractului hidrosolubil liofilizat – produs obținut printr-un procedeu original și care permite solubilizarea propolisului în solvenți apoși cu destinație terapeutică – apă distilată, ser fiziologic, solvenți specifici cu destinație în oftalmologie, etc.(OITA și col., 1981) [39]

Principiul metodei de preparare se bazează pe solventarea compușilor activi din propolis într-un solvent organic (etilendiamină sau dietilaminoetanol), solubilizarea extractului obținut în soluție fiziologică, filtrarea reziduurilor de ceară, și apoi liofilizarea extractului în flacoane de tip antibiotic. Extractul hidrosolubil obținut se prezintă sub forma unei mase de consistență spumoasă care se solubilizează în orice proporție cu apa distilată, serul fiziologic și solvenți apoși specifici destinației terapeutice pentru care este folosit.

Cu acest extract hidrosolubil se prepară soluții pentru aerosoli în tratamente ORL și bronhopulmonare precum și soluții și aerosoli de uz oftalmic.

3.2. Solventarea principiilor active din propolis

Prin aplicarea metodelor de înaltă performanță – cromatografie lichidă (HPLC) (BANKOVA și col., 1982) [40] gaz-cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (ABD EL-HADY și col., 1994 (a,b) [41,42] au izolat din propolis următoarele grupe de compuși:

- esteri ai acizilor fenolici	- 72,7%
- acizi fenolici	- 1,1%
- acizi alifatici	- 2,4%
- dihidrochalcone	- 6,5%
- chalcone	- 1,7%
- flavanone	- 1,9%
- flavone	- 4,6%
- derivați de tetrahidrofuran	- 0,7%

Pentru detectarea acestor compuși, propolisul a fost supus extracției în următorul amestec de solvenți: metanol-eter etilic-acetonă-cloroform în raport 1:1:1:1.

Alte extracții aplicate propolisului brut au utilizat ca solvenți alcoolul etilic 15% (v/v), alcool etilic 70% și alcool etilic absolut rece sau fierbinte.

Așa cum arată rezultatele obținute, în extractele alcoolice de propolis se regăsesc compuși flavonoizi, terpeni, derivați ai acidului cinamic, acizi alifatici și acizi fenolici.

Fracțiunea volatilă de distilat prin antrenare cu vapori de apă a prezentat următorii compuși: acid benzoic, alcool benzilic, acid sorbic, vanilină și eugenol. Distilatul prin antrenare cu vapori conține: eter fenil vinilic, anisil-vinil-eter și ciclohexil benzoat – compuși presupuși a fi artefacte experimentale.

Studiile efectuate pe propolisul recoltat de pe mugurii și scoarța de eucalipt – specific Braziliei și zonelor cu climat mediteraneeen – s-au identificat un mare număr de hidroxi și metoxi stilbeni, explicația unei astfel de prezențe putând fi faptul că albinele la recoltarea materialului rășinos transformă stilbenii naturali prin metilare sau demetilare în pterostilbeni.

Alte tipuri de extracții aplicate propolisului brut au fost cele care utilizează ca solvenți apa și diferite concentrații de etanol. Capacitatea de extracție a acestor solvenți se poate estima prin măsurarea spectrului de absorbție în UV.

Prepararea extractelor apoase și etanolice de propolis

PARK și col., (1998) [43] au încercat obținerea unui extract etanolic de propolis pentru care s-a aplicat următorul procedeu: propolisul brut, uscat, a fost măcinat pentru obținerea unei pudre fine din care s-au prelevat mostre a câte 2 g tratate cu câte 25 ml soluție apoasă de etanol 80%. Amestecul obținut este menținut timp de 30 de minute sub agitare continuă la temperatura de 70°C. După extracție, amestecul este centrifugat, iar supernatantul obținut este denumit extract etanolic de propolis.

Pentru obținerea extractului apos MATSUSHIGE și col., (1996) [44] au folosit eșantioane de 2 g de propolis care au fost tratate cu 25 ml apă deionizată, agitate timp de 2 ore la temperatura de 95°C, după marcarea prealabilă a nivelului din tuburile de testare; după agitare, extractele se răcesc la temperatura camerei și se revine la nivelul inițial al soluției prin adăugarea de apă deionizată. Conținutul tuburilor este centrifugat pentru obținerea supernatantului desemnat ca fiind extractul apos de propolis. Este important de menționat că s-a lucrat pe eșantioane de propolis recoltat din diferite regiuni ale Braziliei.

Pentru determinarea conținutului în principii active din extractele obținute s-a aplicat metoda de măsurare a spectrelor de absorbției în UV. Extractele au fost scanate la lungimile de undă cuprinse între 200 – 500 nm, la un spectrofotometru UV. Pentru determinarea spectrelor de absorbție analiza s-a efectuat pe complexul metal (aluminiiu)-flavonoid (chelatare). Reactivul folosit a fost azotatul (nitratul) de aluminiu 10% - 0,1 ml, 0,1 ml acetat de potasiu 1M și 4,3 ml etanol 80%. Câte 0,1 ml din fiecare extract de propolis au fost tratați cu câte 0,5 ml de amestec de reactivi.

Nivelul de absorbție (absorbanța) al extractelor etanolice și a extractului apos de propolis sunt prezentate în tabelul 2. Toate probele analizate au prezentat un maxim de absorbție la lungimea de undă de 290 nm. Totuși gradul de absorbție

la 290 nm a fost variabil în funcție de concentrația soluțiilor de etanol. Extractul apos a prezentat cea mai scăzută valoare a absorbției, care totuși a crescut progresiv cu concentrația de etanol până la 80%. Extractele cu concentrații de etanol de 90% și 95% au prezentat o scădere a absorbției la 290 nm. Așa cum s-a menționat în lucrări anterioare (MARKHAM, 1982; KUNO, 1987), [45, 46] apariția benzilor de absorbție la lungimile de undă de 270 – 330 nm este atribuită flavonoizilor și fenolilor. Cu alte cuvinte cea mai mare concentrație de flavonoizi a fost eliberată la utilizarea etanolului de 80%. Pe de altă parte, amestecurile de extracte etanolice de propolis cu nitrat de aluminiu și acetat de potasiu modifică complet spectrele de absorbție, cu formarea unui nou peak de absorbție maximă la lungimea de undă de 310 nm. Modificarea maximului de absorbție se datorează formării complexului (chelate) metalic cu flavonoizii. Cea mai mare parte a flavonoizilor naturali sunt polifenoli care conțin una sau mai multe grupări O-dihidroxil și hidroxiceto care sunt implicate în formarea complexelor metalici. Formarea complexului metal-flavonoizi induce o schimbare a spectrului de absorbție maxim (JURD și GEISSMAN, 1956; PORTER și MARKHAM, 1970) [47, 48].

Tabelul nr.2

Absorbanța extractelor etanolice și apos de propolis

Extracte de propolis	Absorbanța extractelor La 290 nm	Absorbanța complex la 310 nm
Extract apos	0,4434	0,4341
10% etanol	0,5115	0,4782
20% etanol	0,5965	0,5471
30% etanol	0,7401	0,7002
40% etanol	1,0575	0,9290
50% etanol	1,7802	1,5637
60% etanol	2,4668	2,1455
70% etanol	2,6931	2,2860
80% etanol	2,9844	2,7154
90% etanol	2,6334	2,2692
95% etanol	2,5298	2,1980

Așa cum se poate observa din acest tabel, s-a concluzionat cu extractele de propolis în soluție etanolică 80% conțin cea mai mare concentrație de flavonoizi.

Pentru determinarea activităților biologice ale propolisului, în Japonia (MIYATAKA și col., 1997)[49] propun prepararea unor extracte etanolice și apoase de propolis, aplicând tehnici de laborator specifice.

Conform acestor autori propolisul este supus extracției în etanol de concentrație de 99,5%. 5 părți (volume) de etanol 99,5% sunt introduse într-un recipient etanș ce conține 1 parte (greutate) propolis brut. Amestecul obținut este lăsat în repaus timp de 10 zile, cu agitări ocazionale. Soluția obținută după perioada de extracție este supusă filtrării printr-un filtru No.2 (dimensiunea porilor 5μ). Reziduul de pe hârtia de filtru este spălat cu solventul de extracție. Soluția de spălare este combinată cu filtratul obținut și volumul total al soluției obținute este adus la 200 ml cu etanol 99,5%. Reziduurile au fost în prealabil uscate pe sulfat de sodiu anhidru. După măsurarea greutății reziduului obținut cantitatea extrasă în fiecare extract și concentrare în etanol de 99,5%, se determină prin scăderea valorii obținute din masa inițială a propolisului luat în lucru. Concentrația extractului de propolis – accesibilă pe piața internațională este cuprinsă între 2,7 – 12,5%.

În cazul extractului apos, 5 părți (volumetric) de apă distilată degazată prin încălzire și apoi răcită la temperatura camerei sunt introduse într-un vas etanș cu 1 parte (în greutate) de propolis. Amestecul obținut este lăsat în repaus timp de 10 zile cu agitări ocazionale. Toate operațiile ulterioare sunt identice celor pentru prepararea extractelor etanolice.

Teste asupra acțiunii biologice a propolisului au fost efectuate și cu alt tip de extract de propolis – respectiv cu un extract apos de concentrație 13% w/v produs în Danemarca de firma Propharma A/S.

În Cuba se prepară un extract de propolis roșu – prin suspendarea a 1 g produs brut în etanol 95% (v/v). suspensia este decantată după 48 ore de păstrare la temperatura camerei. Extractul obținut are o concentrație de 70% (w/v) și se recomandă păstrarea sa la temperatura de 4°C (NELSON MERINO și col., 1996) [50].

Tot pe propolisul brazilian s-au efectuat teste pe extracte obținute cu apă fierbinte. Alte extracte obținute – în metanol și cloroform au fost preparate prin reluarea reziduului de la filtrare cu acești solvenți. (BASNET și col., 1996) [51].

4. Activitatea biologică a extractelor de propolis și a diferitelor fracțiuni ale acestora

Propolisul este cunoscut astăzi ca unul dintre cele mai surprinzătoare produse naturale datorită studiilor și cercetărilor efectuate care atribuie acestuia și diferitelor sale fracțiuni nenumărate acțiuni biologice și efecte terapeutice. Între

acțiunile terapeutice se pot enumăra: antimicrobiană, antibiotică, antifungică, antiinflamatorie, analgezică, antioxidantă și anti-tumorală.

La ora actuală, pe plan mondial, propolisul este utilizat pe scară largă în diferite formule de medicamente (îndeosebi în Europa răsăriteană), suplimente sau aditivi alimentari și băuturi pentru a îmbunătăți starea de sănătate și pentru prevenirea unor afecțiuni: inflamatorii, boli cardiace, hepatice, diabetul și chiar unele forme de cancer.

Cu toate aceste dovezi asupra virtuților sale terapeutice, șansa de a se transforma dintr-un remediu empiric într-un medicament, depinde foarte mult de purificare, standardizare și supunerea sa la toate celelalte etape de cercetare și control: chimic, tehnologic, toxicologic, preclinic și clinic.

Progresul realizat în domeniul chimiei, farmacodinamiei și a tehnologiilor farmaceutice au condus la stabilirea anumitor reguli pentru medicamente, între care cea mai severă este cea privitoare la o anumită relație ce trebuie să existe între produsul respectiv și efectele sale asupra organismelor. Din această relație se naște noțiunea de doză terapeutică, mai ales pentru substanțele active pure, indiferent de forma farmaceutică în care acestea sunt prezentate.

Prin standardizarea extractelor, tincturilor, etc., noțiunea de doză poate fi extinsă și la medicamentele sau produsele care sunt amestecuri naturale de substanțe active. Standardizarea înseamnă deci uniformizarea concentrației în principii active din produsele finite – dimensiune ce poate fi exprimată prin componentul cel mai caracteristic.

Atunci când metodele fizico-chimice nu pot fi aplicate, standardizarea se poate face utilizând o metodă de control biologic. Oricum, standardizarea extractelor naturale este de multă vreme o condiție de la sine înțeleasă.

Propolisul este cunoscut ca fiind activ la nivelul organismelor, dar în cursul ultimelor decenii, s-a raportat o largă varietate a compușilor săi. De aceea extractele de propolis de uz medicinal trebuie să răspundă cerinței privitoare la raportul dintre cantitatea administrată și efectul obținut; aceasta înseamnă că atât experimentele de laborator cât și cele clinice trebuiesc efectuate numai cu extracte standardizate.

Orice extract, presupune înainte de orice altceva, să se obțină un produs mai pur; un extract standardizat oferă posibilitatea de a fi administrat în anumite cantități ce conțin concentrații controlate de substanțe active, astfel încât cu siguranță el să fie lipsit de toxicitate, să ofere o eficiență terapeutică maximă și să permită individualizarea tratamentelor.

Extractul de propolis standardizat, departe de a fi un produs toxic, este totuși capabil să prezinte o serie de efecte secundare atunci când anumite doze sunt depășite. Modificarea dozelor poate induce efecte diferite sau chiar eșecuri terapeutice.

În acest sens, experiența României – prin Centrul Medical de Apiterapie al Institutului de Cercetare și Dezvoltare pentru Apicultură, a dovedit că rezultatele experimentelor biochimice și farmacologice efectuate pe organisme sănătoase precum și efectele sale pe organisme animale cu stări patologice induse – sunt elemente fundamentale în planificarea și efectuarea unui experiment clinic.

Extractul de propolis standardizat (extractul moale sau spiss) a fost supus unor experimente biochimice pentru a i se demonstra eficacitatea asupra ficatului, sângelui, sistemului muscular, organelor limfatice, glandelor suprarenale, metabolismul general al glucidelor precum și în anumite aspecte imunobiologice.

Datele privitoare la efectele propolisului asupra organismului animal cu condiții patologice induse privesc acțiunile hepatoprotectoare și antiinflamatoare precum și investigații asupra acțiunii epitelizante, asupra permeabilității vasculare și acțiunea antivirală (testată pe anumite virusuri multiplicare în culturi de țesuturi).

4.1. Acțiuni fundamentale ale flavonoizilor și consecințele lor fiziologice

Efectele observate ca urmare a consumului de flavonoizi își pot avea originea din cele trei principii fundamentale ale acțiunii lor:

- modificarea activităților enzimatică prin fosforilare
- antioxidare
- represiune genică

Consecințele fiziologice ale acestor 3 acțiuni principale sunt:

- acțiunea antialergică
- acțiunea antivirală
- acțiunea anestezică
- acțiunea anti-tumorală
- acțiunea antiinflamatoare (aspirin-like)

Acțiunea antialergică

Simptomele reacțiilor alergice ca dispneea – obstrucția căilor aeriene prin contracția musculaturii bronșice – înroșirea pielii, secreția excesivă a nasului (rinită) și de suc gastric precum și creșterea temperaturii, apar ca rezultat al eliberării de histamină din mastocite. Histamina este eliberată atunci când agentul patogen (alergenul) este legat de imunoglobulina E din membrana externă a mastocitelor. Ca rezultat, pe fondul consumului de ATP, canalele specifice pentru ioni de calciu din membrana externă a mastocitelor se deschid, permițând penetrarea acestora în celule. Datorită sarcinii lor pozitive duble, ioni de calciu permit eliberarea a două molecule de histamină, care la rândul lor poartă fiecare câte o singură sarcină pozitivă.

Datorită mării capacități de reacție, adenozintrifosfatul (ATP) care deschide canalele de calciu, va acționa preferențial pentru fosfat. Ca urmare, în prezența flavonoizilor, canalele de calciu rămân închise și mastocitele nu mai pot elibera histamina astfel încât simptomele reacției alergice nu se mai produc. Este cunoscut faptul că chromoglycan-ul și medicamentul Intal constau dintr-un inel cromanic și un flavonoid. Aceste substanțe sunt folosite de multă vreme ca medicamente în combaterea alergiilor (KLIMMEK, 1988) [52].

După cum se știe, propolisul conține o anumită cantitate de polen și atunci când acesta nu este eliminat prin procedee corespunzătoare, unii pacienți mai sensibili pot dezvolta alergii la propolis. Este unul din motivele pentru care propolisul este suspectat a fi un potențial alergen. Propolisul poate fi însă incriminat de apariția alergiilor și datorită conținutului (în unele sorturi) în esteri ai acidului cinamic și ai acidului cafeic (HAUSEN și col., 1987; SCHULER și col., 1988; ITOH și col., 1994) [53, 54, 55].

O altă potențială sursă de alergenicitate este veninul de albine prezent deasemenea în propolis în cantități foarte mici. De obicei, veninul de albine este extras cu solvenți apoși, motiv pentru care și acesta poate fi incriminat pentru acțiunea alergică a propolisului.

Acțiunea antivirală

Se știe că virusurile constau dintr-un nucleu infecțios ce conține un acid nucleic (DNA sau RNA) și o manta proteică. Adeseori, acestea pot penetra ușor în celulele umane. Pentru a deveni active, mantaua lor proteică trebuie să fie digerată de enzimele prezente în lizosomi. Lizosomii sunt vezicule acoperite de o membrană lipidică care în prezența flavonoizilor nu poate fi penetrată de virusuri. Fondul acestui fenomen nu este încă deplin înțeles, dar se poate emite o ipoteză. Un exemplu ar putea fi neutralizarea grupărilor amino din mantaua proteică prin fosforilare – o prezumție pentru penetrarea membranelor lipidice lizosomale.

DEBIAGGI și col., (1990)[56] au testat efectele antivirale a 5 specii de flavonoizi specifici prezenți în propolis: crizina, kaempferol, acacetina, galangina și quercetina. Utilizând culturi de celule *in vitro*, s-a determinat replicarea și infectivitatea unor tulpini de virus herpetic, adenovirus, coronavirus și rotavirus. Crizina și kaempferolul au prezentat o acțiune inhibitorie dependentă de doză asupra replicării virale intracelulare a tuturor tulpinilor virale testate dar nu afectează infectivitatea acestora. Ambii flavonoizi se dovedesc foarte activi în inhibarea replicării diferitelor tipuri de virusuri herpetice (HSV – herpes simplex): HSV-2 (0,2 μg/ml și 0,1 μg/ml), HSV-1 (0,5 μg/ml și 2 μg/ml). La 10 μg/ml crizina și kaempferolul reduce replicarea virusurilor în proporții de 45% și respectiv 65% la coronavirusul bovin, 30% și 50% la coronavirusul uman,

rotavirusul SA-II 25% și respectiv 35%. Quercetina la doza de 60μg/ml și crizina la 10 μg/ml au redus infectivitatea virusurilor herpetice (HSV-2, HSV-1 și TK-HSV-1) cu aproximativ 65% și respectiv 50%. (CHENG și WONG, 1996) [57].

AMOROS și col., (1992a) [58] au observat că propolisul este foarte activ *in vitro* împotriva virusului polio și herpetic. La o concentrație de 30 μg/ml propolisul reduce titrul virusurilor herpetice de 1000 de ori, inhibă replicarea HSV cu 99,5% și inhibă total formarea plăgii de poliovirus. S-a observat de asemenea și o acțiune virulicidă asupra virusurilor încapsulate, herpes simplex și virusul stomatitei veziculare (VSV). În acest caz se sugerează că flavonoizii galangină și crizină – majoritari în eșantioanele de propolis recoltat din Franța (și în general din zona europeană) acționează sinergic în acțiunea antivirală a propolisului.

Într-un studiu mai aprofundat asupra acțiunii inhibitoare a flavonoizilor asupra virusurilor, AMOROS și col., (1992b) [59] au observat efecte sinergice individuale și binare ale flavonolilor (galangină, kaempferol și quercetină), flavonelor (crizină, apigenină, luteolină și tectocrizină) și a flavanonelor (pinocembrină și izosakuranetină) asupra infecției cu virus herpetic de tip I și replicarea acestuia în celule renale de maimuță *in vitro*. Tot această echipă a constatat că flavonolii sunt mai eficienți în reducerea titrului virusurilor; totuși s-a constatat că galangina este activă în timp ce crizina nu prezintă activitate, contrazicând astfel rezultatele obținute de DEBIAGGI și col., (1990)[56]. Autorii au atribuit contradicția:

- diferenței între tulpinile de HSV-1
- diferenței dintre timpii de incubație (48 de ore mai puțin decât Debiaggi și col., 1990) [56]
- diferiților parametri de lucru

Activitatea flavonolilor descrește în ordine inversă cu numărul de grupări hidroxil substituie: galangină > kampferol > quercetina. Afinitatea compusului la lipide (lipofilie) pare să aibă o importanță deosebită pentru activitatea biologică. Numai galangina, kaempferolul și balsamul de propolis pare să fie activi cu adevărat împotriva HSV-I. Alți constituenți de tipul metoxiflavonelor minore sau conjugați de tip cafeoil pot contribui la rândul lor la acțiunea antivirală. În plus, atunci când doi flavonoizi diferiți au fost administrați împreună, s-a observat un sinergism semnificativ împotriva HSV-I, cu combinații de flavonoli și flavone care produc o reducere semnificativă a virusului. Cele mai importante combinații binare au fost: kaempferol + luteolină; quercetină + crizină; galangină + apigenină; kaempferol + apigenină; quercetină + apigenină. Adeseori sinergismele indică diferite moduri de acțiune dar întrucât mecanismul (ele) inhibiției virale mai trebuie încă elucidate, se fac încă speculații.

Propolisul și extractele sale precum și o serie de soluții de flavonoizi s-au dovedit mijloace eficiente în sistarea replicării agentului patogen al hepatitei virale HbsAg (MORFEI și col., 1980) [60].

Acțiunea analgezică

Unele procese dureroase apar ca rezultat al producerii de prostaglandine la locul leziunii (răni). Formarea acestor prostaglandine poate fi stopată de flavonoizi prin acțiunea lor de inhibare a acțiunii enzimei prostaglandin-ciclooxigenaza (PG-ciclooxigenază).

Acțiunea anti-tumorală (anti-cancer)

Una dintre explicațiile acestei acțiuni a flavonoizilor este următoarea: celulele tumorale sunt caracterizate printr-o activitate insuficientă a pompelor ionice ale ATP-azei. Ca urmare, în timp, enzima ATP-ază devine inactivă, deoarece centrul său activ este blocat prin fosforilare. Flavonoizii modifică acest proces de fosforilare probabil prin captarea grupărilor fosfat. Prin acest proces, activitatea celulelor poate reveni la normal (KLIMMEK, 1988) [52]

În 1991 (MATSUNO și col.) [61] a raportat prezența în propolisul brazilian a trei compuși cu acțiune anti-tumorală. Acești compuși sunt quercetina, esterul fenilic al acidului cafeic și un nou compus – clerodan-diterpenoid – ultimul fiind centrul atenției. Clerodan-diterpenoidul a demonstrat stoparea dezvoltării celulelor tumorale în faza S și a prezentat o degradare masivă asupra celulelor tumorale HuH13 în nu mai puțin de 3 zile – în medii de cultură. Pe de altă parte, un slab efect citotoxic a fost observat asupra celulelor renale de iepure aflate în stadiu primar – fără transformări, și asupra celulelor diploide umane. Urmărind această substanță s-a demonstrat că ea prezintă și acțiune antibacteriană, poate ucide celulele tumorale hepatice fără a le leza pe cele normale. Un an mai târziu, 1992 [62], același autor a arătat că prin administrarea de propolis brazilian la un pacient afectat de cancer, s-a produs o activare a limfocitelor T-killer și a macrofagelor din țesutul afectat – fapt ce a produs inhibarea creșterii tumorii.

În 1993, ARAI și col., [63] de la laboratoarele biochimice Hayashibara au ajuns la concluzia că propolisul activează macrofagele, induce producția de citokine și restrânge dezvoltarea de metastaze în cancerul de colon. În rapoartele lor ei au arătat clar că propolisul acționează direct asupra macrofagelor pentru a le amplifica funcțiile și lucrând împreună cu antigenul induce producția de factor de necroză tumorală, interleukin-1 și interferon, ținând metastazele la nivelul plămânilor la valori sub 60%.

KIMOTO și col., (1994, 1995) [64, 65] au reușit să identifice și să izoleze din propolisul brazilian – artepillina C – un compus cu o puternică acțiune anti-tumorală – prezentă în produs în concentrații de aprox. 5%. Artepillina C s-a dovedit extrem de eficientă îndeosebi asupra celulelor leucemice și se așteaptă ca în viitor ea să fie administrată prin injecții intravenoase ca adjuvant în chemoterapia acestei afecțiuni.

Studiile efectuate au demonstrat că constituenții propolisului care prezintă o puternică acțiune anti-tumorală sunt:

- derivați ai acidului cafeic
- flavonoizi
- acidul 2,2-dimetil-8-prenil-cromen-6-propendioic
- artepillina
- acidul 17-hidroxicleroda-3m(13Z)-dien-15-oic (MARCUCCHI, 1995; MATSUNO și col., 1995, 1996, 1997) [66, 67, 68, 69]

Acțiunea de tip aspirină (aspirin-like)

Aspirina – acidul acetilsalicilic – inhibă, în același mod ca și flavonoizii, acțiunea enzimelor reponsabile pentru sinteza prostaglandinelor – PG-ciclooxygenază și lipooxygenază. Acesta este principalul motiv pentru care flavonoizi sunt recunoscuți ca “aspirină naturală”.

4.2. Mecanisme de acțiune ale flavonoizilor

Inhibarea sau activarea unor enzime

Asemănarea dintre aminoacidul tirozină (Tyr) și structura de bază a flavonoizilor poate conduce la un proces competitiv de fosforilare. Fiind mai nucleofili decât tirozina, flavonoizii sunt fosforilați înaintea aminoacidului. Acesta este un posibil mecanism prin care se poate produce inhibarea sau activarea unor enzime. Tot acest proces poate fi o posibilă explicație pentru oprirea evoluției tumorilor.

Acțiunea antioxidantă

Structura de bază a flavonoizilor conține un inel cromatic care în condiții de oxidare poate fi deschis cu ușurință pentru a forma un radical liber (RL). Radicalul liber format poate distruge cu ușurință alți radicali liberi pe care îi găsește în organism și care produc distrugerea tisulară. Radicalii liberi pot fi

produși ca rezultat al iradierii cu raze X (raze Roentgen) sau iradiere cu substanțe radioactive.

Acțiunea reducătoare a flavonoizilor stopează distrugerea acidului ascorbic (vitamina C) prin oxidare și transformă ionul de fier trivalent (Fe^{3+}) în forma sa fiziologică – bivalentă. În plus, flavonoizii se pot lega puternic de ioni de metale grele (cupru bivalent, mercur bivalent și plumb bivalent). Altfel, unele metale grele vor avea tendința de a cere autooxidarea anumitor elemente esențiale : substanțe nutritive, acizi grași polinesaturați și de asemenea de a inhiba activitatea anumitor enzime.

Represia genică

Represia genică este o acțiune importantă a anumitor hormoni cum sunt estrogenii și glucocorticoizii.

Hormonii glucocorticoizi controlează metabolismul carbohidraților. Unii flavonoizi prezintă astfel de acțiuni de tip hormon-like. Flavonoidul sylibina și cortizonul au o foarte apropiată asemănare structurală, fapt ce ar putea explica acțiunea lor comună.

Acțiunea flavonoizilor în diabetul zaharat

În această boală zaharoza este transformată în grăsimi și astfel circulația sanguină la nivelul organelor – ochi și intestin, de exemplu – este oprită. Cu cât glucoza este menținută mai mult timp la nivelul unui organ, ea este redusă de enzima aldosereductază la hexitol – un compus stabil ce nu mai suferă transformări. Prin osmoză hexitolul atrage multă apă din sânge și o reține în celule, care la nivel funcțional sunt marcate. La nivelul ochilor se produce o suprapresiune în timp ce la nivelul intestinului absorbția compușilor nutritivi este diminuată.

Flavonoizii inhibă activitatea aldosereductazei, diminuând astfel tulburările la nivelul ochilor și normalizând funcția intestinală.

Acțiunea antimicrobiană a flavonoizilor din propolis

Extractul etanolic de propolis (EEP, 70% extract etanolic) cunoscut după s-a menționat și sub denumirea de “balsam de propolis” a fost utilizat de GRANGE și DAVEY (1990) [70] în culturi bacteriene în placă, demonstrându-se eficacitatea sa în inhibarea dezvoltării unor tulpini de *Staphylococcus aureus* – mai ales cea care a devenit rezistentă la antibioticul methicilină. Mai mult, balsamul de propolis acționează preferențial în inhibarea cocilor și bacililor Gram-pozitivi la o concentrație de 3 mg/ml. Se speculează că compușii activi din balsamul de propolis

cuprind flavonoidul galangină (3,5,7-trihidroxiflavonă) și CAPE (esterul fenetic al acidului cafeic – caffeic acid phenethyl ester) și că aceste sinergisme, în care efectele mai multor componente se combină pentru a obține un efect mai puternic, sunt posibile întrucât componentele singulare au efecte inhibitorii mult mai reduse.

Mecanismul de acțiune este considerat a fi o inhibare a RNA-polimerazelor bacteriene dependente de DNA prin acțiunea unui component hidrosolubil din propolis cu absorbție în UV (GRANGE și DAVEY, 1990; SIMUTH și col., 1986) [70, 71].

BRUMFIT și col., (1990) [72] au observat că extractele de propolis obținute în apă și soluții tampon la pH 5 și 6, sau extractele în petrol nu prezintă nici un fel de activitate asupra tulpinilor bacteriene testate. Totuși extractele în soluții tampon la pH 7 sau 8, extractele etanolicе, cele în DMSO (dimetil-sulfoxid), cloroform sau acetonă au inhibat tulpini de *Staphylococcus aureus*, *Bacteroides subtilis* și *Candida albicans*. Zonele de inhibiție variază între 7 – 14 mm în diametru. *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus faecalis* și grupul B de coci nu au fost inhibați de nici unul dintre extractele menționate. Extractele obținute cu solvenți organici au fost slab active asupra unor tulpini de *Staphylococcus aureus* (3 sensibile la methicilină și 2 rezistente la acest antibiotic), *Streptococcus epidermis*, *Clostridium* spp. și *Candida albicans*, dar inactive asupra streptococilor, *Corynebacterium xerosis* și speciile Gram-negative. Într-un alt studiu, efectuat *in vivo* nu s-a constatat nici un fel de activitate în urina prelevată de la 3 voluntari care au consumat 500 mg de pudră de propolis, de 3 ori pe zi, timp de 3 zile.

O bună acțiune antibacteriană (mai ales asupra bacteriilor Gram-pozitive), antifungică (în special asupra fungilor responsabili de apariția infecțiilor superficiale ale pielii) și antiinflamatoare (față de modele de inflamații acute și cronice) au fost observate de DOBROWOLSKI și col., (1991) [73].

4.3. Acțiunea esterilor acizilor fenolici

CAPE (esterul fenetic al acidului cafeic) este un alt constituent al propolisului cu acțiune biologică importantă. GRUNBERGER și col., (1988) [74] au observat efectul CAPE asupra celulelor canceroase umane *in vitro* prin măsurarea gradului de incorporare a timidinei tritiate în structura DNA a caarcinoamelor umane de sân (MCF-7) și linii de celule de melanoame (SK-MEL-28, SK-MEL-170). Concentrațiile de CAPE de 5 μg/ml și 10 μg/ml inhibă și blochează complet incorporarea de timidină tritiată. Același tip de inhibiție a fost

Tabel nr.3

Acțiunea antibacteriană și antifungică a propolisului

Organisme Gram-pozitive

<i>Staphylococcus aureus</i>	- comun în infecțiile localizate producătoare de puroi
<i>Streptococcus pyogenes</i>	- infecții ale gâtului
<i>Streptococcus viridans</i>	- flora normală a tractului respirator superior ce poate produce infecții la bolnavi cu imunodeficiență
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	- cauza comună a pneumoniilor bacteriene
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	- produce difteria

Acțiunea antifungică

<i>Microsporum canis</i>	- viermi inelari la pisici și câini ce se transmit la om
<i>Microsporum gypseum</i>	- infecții al pielii capului și corpului în America de Sud
<i>Phialophora jeanselmei</i>	- urmare injectării acest fung poate provoca moartea țesuturilor profunde din corp
<i>Piedraia hartae</i>	- fung parazit la nivelul părului
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	- atacă părul, unghiile și pielea
<i>Trichophyton rubrum</i>	- atacă părul unghiile și pielea
<i>Trichosporon cutaneum</i>	- se găsește în intestin, tractul respirator și pe piele și poate afecta pacienții cu debilități, rar fatal.

Propolisul în doze de 2 g/kg corp a fost bine tolerat de șoareci.
Conform DOBROWOLSKI și col., 1991

observată și pentru carcinoamele de colon HT29 și renale deși autorii nu prezintă aceste date. Invers, liniile de celule normale, necanceroase (1434 fibroblaste și melanocite) necesită o cantitate de 50 µg/ml CAPE pentru incorporarea de timidină tritiată. Cu totul interesant, liniile de celule tumorale sunt mai sensibile decât liniile de celule normale la acțiunea CAPE. Toate proprietățile CAPE natural și sintetic au fost identice.

În 1991, SU și col.,[75] au studiat toxicitatea CAPE față de celulele normale transformate în celule canceroase cu adenovirusul tip 5 ce conține o fracțiune de DNA genomic necaracterizat cu proprietăți inițiatoare de cancer.

Această fracțiune provoacă activarea transcripției genelor celulare și virale, induce sinteza DNA și mitoză celulelor diferențiate. În mod clar, caracteristicile celulelor transformate par a produce cancer. Rezultatele arată că compusul CAPE inhibă preferențial sinteza DNA și creșterea în celulele transformate AD5EIA, iar la concentrații ridicate de CAPE, celulele transformate sunt ucise. Mecanismul inhibiției competitive este necunoscut dar se crede că este legat de starea de transformare. Când celulele au fost transformate cu alte gene cum ar fi de exemplu Ha-*ras* oncogenă și virusul papilomului bovin tip I, au fost la rândul lor inhibitate selectiv. Probabil, celulele transformate au funcții ale membranelor celulare alterate sau o fiziologie celulară care permite activitatea CAPE.

Într-un studiu de confirmare, GUARINI și col., (1992) [76] au determinat efectele CAPE asupra a două linii de celule tumorale, melanomul uman HO-I și glioblastomul multiform uman GBM-18- rezultatele au fost comparate cu ale altor modulatori, mezerein (MEZ), acidul micofenolic (MPA) și acidul retinoic (RA). Mai mult, s-au studiat și combinații ale CAPE cu acești modulatori. Rezultatele surprinzătoare arată că în combinație cu MEZ, CAPE prezintă un foarte puternic efect antiproliferativ și a fost singurul tratament care a suprimat complet creșterea în linia de celule GBM-18.

4.4. Alți esteri aromatici

Derivații sintetici ai esterilor acidului cafeic prezintă la rândul lor efecte similare cu CAPE. Cafeatul de metil (MC), fenetil cafeatul (PEC) și feniletil dimetilcafeatul (PEDMC) au fost testați pe tulpini mutagenizate cu 3,2'-dimetil-4-aminobifenil de *Salmonella typhimurium* (TA 98 și TA 100) și pe celule de carcinom de colon (HT-29) (RAO și col., 1992) [77]. S-a arătat că PEC și PEDMC mai lipofili sunt mai eficienți în inhibarea creșterii celulare și a sintezei de DNA decât MC, fapt ce arată că penetrarea prin membranele celulare este importantă pentru activitatea esterilor acidului cafeic. Mai mult, acești compuși au redus activitatea ornitin-decarboxilazei și a protein-tirozinkinazei, două enzime asociate cu creșterea nelimitată a noilor celule și proliferarea acestora.

Detalierea ulterioară a efectelor acestor compuși, a mecanismelor, a farmacocineticii și a relațiilor structură-activitate va permite realizarea de experimente clinice pe subiecți umani.

5. Probleme legate de aplicarea extractelor de propolis și a preparatelor acestuia în terapia umană

Așa cum s-a văzut, unii flavonoizi sunt hidrosolubili, alții nu sunt. Solubilitatea lor depinde de starea în care se găsesc în natură: legați de zaharuri (agliconi flavonoidici) sau nu.

În plus, cunoscuți ca antioxidanți exogeni naturali (fenoli și derivați fenolici), totuși flavonoizii nu se comportă ca antioxidanți fenolici clasici de tipul alfa-tocoferolului ci prezintă activități moderate de rupere a catenelor (chain-breaking). Ei pot fi “chain breaking – donors” (fenolii și polifenolii – ce formează un radical mai stabil ce nu mai reacționează) sau “chain breaking – acceptors” care sunt activi la presiuni reduse de oxigen când nivelul concentrației de alkil este egal cu cel al radicalului peroxid și acționează ca “radical scavenger”, cum este cazul aminelor aromatice și din nou fenoli mascați.

Ca pentru toți antioxidanții fenolici și polifenolici – activitatea lor este determinată de grupările OH mascate (această categorie cuprinde și derivații de pirocatechol, trifenoli, tetrafenoli și în special tocoferolii și derivații acestora care sunt cei mai importanți antioxidanți biologici.

Eficacitatea lor antioxidantă este strâns legată de numeroși factori, între care foarte mult de etapa de reacție radicalică, tipul mecanismului de acțiune și cinetica reacției în care sunt implicați.

În medicină, în vederea obținerii unei mai bune stabilizări a substratului, se folosesc pe larg amestecuri de antioxidanți. Eficacitatea de acțiune a acestor amestecuri se datorează acțiunii antioxidante rezultantă din acțiunea fiecărui component. Propolisul este un astfel de amestec natural de antioxidanți cu acțiune sinergică. Acțiunea sinergică a compușilor din propolis se datorează de obicei aceluiași tip de mecanism de acțiune (de exemplu – chain-breaking – chain-breaking, sau unul diferit: chain-breaking – radical scavenger).

Acțiunea antioxidantă a propolisului a fost demonstrată prin diferite studii *in vitro* și *in vivo*. Această activitate antioxidantă are ca rezultat multe efecte clinice obținute ca urmare a aplicării preparatelor pe bază de propolis (BASNET și col., 1996; RODRIGUEZ și col., 1997; MATSUSHIGE și col., 1996) [51 , 78, 44].

Unul dintre cele mai impresionante efecte ale propolisului este cel legat de acțiunea protectoare împotriva radiațiilor (în special radiații gamma, dar și cele împotriva radiațiilor UV – KROL și col., 1990; HERMANN și BRACAMONTE, 1990) [79 , 80]. Producerea de radicali liberi în organismele expuse la aceste radiații are ca rezultat distrugerea țesuturilor.

Extraktele apoase de propolis utilizate au prezentat un efect inhibitor asupra creșterii asociate a peroxidării lipidelor precum și o accentuare a activității SOD la organismele expuse.

Studiile *in vitro* arată că aceleași extrakte apoase de propolis prezintă prin aceeași activitate antioxidantă o bună protecție hepatică (RODRIGUEZ și col., 1997; BASNET și col., 1996; LIN și col., 1997; BASNET și col., 1996(2); MERINO și col., 1996; MARKHAM și col., 1996; GIURGEA și col., 1987) [78, 81, 82, 83, 50, 84, 85]. Aceste extrakte protejează împotriva eliberării de lactat-dehidrogenază glutathion-dependentă și împotriva formării de peroxizi lipidici.

Revenind asupra efectelor sinergice ale compușilor din propolis (CHENG și WONG, 1996) [57] trebuie menționate efectele antioxidante ale balsamului de propolis în inhibarea linoleatului de metil de către benzil-cafeat.

Flavonoizii și în acest caz propolisul s-au dovedit un excelent mijloc natural în inhibarea puternică a xenobioticelor – cum este cazul intoxicației induse cu tetraclorură de carbon și intoxicația alcoolică la nivelul ficatului (GIURGEA și col., 1987) [85]. Tetraclorura de carbon CCl₄ produce un radical foarte toxic și foarte reactiv – CCl₃ implicat în peroxidarea lipidelor sau legarea covalentă cu macromoleculele esențiale la nivelul hepatocitelor.

Bioflavonoizii participă ca antioxidanți la metabolizarea acestor xenobiotice prin sistemul enzimatic al oxidazelor cu funcție mixtă; se știe că activitatea enzimatică este prima țintă a substanțelor toxice și ale derivaților acestora. Efectul de protecție este observat în special la nivelul activităților succinat dehidrogenazei (SDH), glutamat dehidrogenazei (GDH) și citocrom oxidazei.

Efectele propolisului în afecțiunile hepatice

Efectele propolisului asupra ficatului nu se datorează în exclusivitate acțiunii sale antioxidante. Acțiunea hepatoprotectoare potențială poate fi explicată și printr-o scădere a nivelului glucozei sanguine și o creștere a nivelului glicogenului.

Acizii nucleici (DNA și RNA) prezintă niveluri de concentrație ușor modificate. Scăderea ușoară a nivelului DNA la 10 zile după administrarea de extract etanolic de propolis poate fi interpretată ca rezultat al inhibării sintezei proteice. Se știe că unele substanțe din grupa flavonoizilor inhibă sinteza proteică, iar cei aparținând grupului flavonelor și flavonolilor cu grupări HO în pozițiile 3'-4' și 7 sunt potențiali inhibitori ai ribonucleazelor.

Transaminazele (GOT și GPT) cele mai comune enzime verificate în analizele de laborator, prezintă niveluri variabile, creșteri și descreșteri, ceea ce reflectă fie o inhibare fie o activare a activității lor la nivelul țesutului hepatic. O altă posibilă explicație poate fi și modificarea permeabilității membranelor celulare ce favorizează intrarea sau eliberarea lor din celule.

Fosforilaza hepatică prezintă de asemenea niveluri variabile de activitate la diferite intervale de timp: creșteri la intervale de 10, 30 și 60 de zile și scăderi la intervalul de 20 și respectiv 90 de zile. În acest caz, flavonoizii intră în competiție cu procesul metabolic al adrenalinei, acțiune ce este sinergică cu cea a acidului ascorbic (vitamina C). În acest caz, flavonoizii pot fi priviți ca factori de economisire și protecție pentru adrenalină.

Glucozo-6-fosfataza este o enzimă esențială dar nu specifică pentru gluconeogeneză. Activitatea acestei enzime reflectă capacitatea țesutului hepatic de a sintetiza glucoza. Urmare a administrării de extract de propolis se observă o scădere după 10 zile și respectiv 90 de zile și o creștere a activității sale după un interval de 30 de zile de la aplicare.

Steatoza hepatică este rezultatul acumulării de acizi grași la nivelul țesutului hepatic ca sursă de energie pentru hepatocite, datorită consumului excesiv de alcool. O altă potențială cauză este eliberarea de catecholamine, care prin lipoliză periferică, generează producerea de acizi grași ce sunt direcționați spre ficat pentru sinteza lipidelor.

Efectele propolisului asupra sângelui

Principalii parametri ce sunt studiați în testele sanguine sunt cei legați de elementele figurate: eritrocite și leucocite.

Viteza de sedimentare a eritrocitelor (VSH = ESR) prezintă o puternică descreștere după 10 zile de la administrarea extractului etanolic de propolis.

Conținutul în hemoglobină prezintă o scădere după 10 zile și apoi o creștere după 20 de zile de la administrare.

Leucocitele, în special limfocitele prezintă o creștere a numărului după 10 zile. O explicație valabilă atât pentru VSH și numărul de leucocite este efectul de stimulare a sistemului imunitar a acestui preparat. Limfocitele elaborează globuline serice în special fracțiunile gamma și beta care dețin o poziție cheie în apărarea imună a organismului.

Efectele propolisului asupra pancreasului endocrin

Studiile efectuate pe animale de laborator prezintă o creștere a numărului de insule Langerhans și ca rezultat o hipersecreție de insulină. Nivelul crescut de secreție de insulină determină o scădere a nivelului glucozei sanguine și o acumulare sporită de glicogen în ficat și alte organe. În acest caz se poate trage o concluzie: extractul de propolis potențează acțiunea hipoglicemiantă a insulinei.

Studii recente care au folosit un derivat cu magneziu al rutozidului au demonstrat efectul hipoglicemiant al acestui compus flavonoidic (RABINOVITCH și col., 1994; YAMAUCHI și col., 1992) [86, 87]. Se știe de asemenea că în diabetul zaharat de tip I (IDDM – insulin-dependent diabetes mellitus) distrugerea celulelor beta din insulele lui Langerhans este mediată de un mecanism autoimun sau un proces inflamator ce implică radicalii liberi. S-a propus că interleukina 1B (IL-1beta) joacă un rol important atât în medierea distrugerii cât și a disfuncției celulelor beta ceea ce înseamnă generarea de specii reactive de oxigen – inclusiv NO (monoxid de azot) și în final inhibarea funcției mitocondriale și provocarea morții celulelor prin apoptoză (MATSUSHIGE și col., 1996; TURK și col., 1993; UCHIGATA și col., 1982) [44, 88, 89]. Trei funcții la nivelul celulelor beta cum sunt:

- activitatea de radical scavenging
- acțiunea de inhibare a IL-1B
- inhibarea acțiunii NO sintazei

au un rol foarte important în provocarea diabetului zaharat insulino-dependent. Studiile au arătat că extractul apos de propolis prezintă o foarte puternică acțiune de radical scavenging (MATSUSHIGE și col., 1995) [90], precum și de inhibare a IL-1B și a NO sintazei.

Acțiunea antiinfecțioasă-antimicrobiană a propolisului

Așa cum s-a menționat deja, cea mai mare atenție a fost acordată capacității propolisului de a combate stările infecțioase locale și generale. GRANGE și DAVEY (1990) [70] au arătat că o fracție hidrosolubilă termostabilă din propolis, care este stabilă la liofilizare, este foarte eficientă împotriva infecției TBC produsă de *Mycobacterium tuberculosis*.

La utilizarea asociată cu unele antibiotice, eficacitatea și durata de acțiune a extractului de propolis este mult accentuată iar respectivele microorganisme nu dezvoltă rezistență la antibiotice. La administrarea internă, propolisul nu produce disbacterioze ci o stimulare a factorilor imuni specifici și non-specifici și ca rezultat o creștere a rezistenței generale a organismului.

Conform celor deja menționate principalii compuși responsabili pentru această importantă acțiune a propolisului sunt esterii acizilor fenolici cu alcooli aromatici. Când se constată absența unei cantități dozabile de ulei volatil, eficacitatea propolisului nu este aceeași. Deaceia o importanță condiție de calitate a propolisului este existența fracțiunii volatile. Cu cât propolisul este mai aromat cu atât este mai eficient.

Acțiunea antimicrobiană a propolisului îl recomandă a fi aplicat în diferite domenii medicale:

- boli digestive: enterite, diaree cronică, colibaciloză digestivă
- boli genito-urinare: orhite, orhiepididimite, prostatite etc.
- boli respiratorii: bronhopneumonie cronică, TBC pulmonar, TBC limfoganglionar, TBC renal
- boli ORL acute și cronice: rinite, rinofaringite, laringo-traheo-bronșite, amigdalite, otite medii și externe, mezotimpanite
- boli oftalmice: infecții bacteriene și virale ale polului anterior ocular: blefarite, conjunctivite, răni la nivelul ochilor
- boli dermatologice: piodermită profundă, TBC cutanat, răni infectate, intertrigo cu diateză exudativă suprainfectat cu *Candida albicans*, acnee juvenilă, infecții streptococice
- boli ale noilor-născuți și sugarilor: tratamentul moniliazei (*Monilia albicans*)
- boli ginecologice: infecții bacteriene mixte ale colului uterin și vaginale, trichomoniază și micoză vulvo-vaginală.

Principalele tipuri de preparate cu propolis utilizate deja în domeniul medical sunt prezentate ca:

- unguente
- soluții
- spray-uri
- aerosoli
- ovule
- supozitoare
- tablete
- capsule
- siropuri
- colutorii
- colire

Pentru viitor specialiștii din domeniul medicinei și farmacologiei trebuie să reflecteze asupra unor formule de preparate menite să stimuleze reacția fagocitară.

Acțiunea vulnerară a propolisului (capacitatea de vindecare a rănilor)

Această capacitate este rezultanta a mai multor efecte diferite dar competitive. Propolisul nu acționează numai ca agent epitelizant ci și ca: antiinfecțios, emolient, anestezic local și antiedematos (datorită cerii) ci și ca agent producător de rapidă refacere a circulației sanguine la nivelul capilarelor.

Aceste efecte au fost semnalate în tratamentul diferitelor răni:

- arsuri induse experimental
- aplicații post-chirurgicale
- răni perianale
- necrozări de țesuturi
- arsuri accidentale (chimice sau termice)
- plăgi atone (ulcere trofice ale membrelor inferioare)

Farmacodinamia capacității de vindecare a rănilor constă în 2 etape:

- blocarea acțiunii agenților infecțioși începerea proceselor mucolitice și de descumare în zona necrozată;
- stimularea procesului de granulație – favorizând astfel reacția naturală a organismului de a activa procesele regenerative și intensificarea proliferării epiteliale.

Aceste procese sunt însoțite de:

- o îmbunătățire a circulației sanguine și limfatice în zonele tratate cu propolis;
- o diminuare a permeabilității vaselor sanguine (așa numita acțiune de tip vitamină P datorată flavonoizilor);

Denumirea de vitamina P (factor de permeabilitate) a fost aplicată anterior unui grup de flavone (hesperedina, eriodictina, quercetina și rutozidul).

În ulcerele cronice de gambă, propolisul contribuie la restructurarea membranelor capilare, producerea vaselor de neoformație și îmbunătățirea proceselor metabolice celulare și tisulare locale prin:

- reducerea anorexiei tisulare
- reactivarea proceselor enzimatice
- favorizarea restructurării substanței fundamentale dezorganizate.

Aplicarea propolisului limitează lărgirea cicatricelor și reduce o serie de fenomene secundare ca: înmugurirea, formarea de eczeme.

Acțiunea antiedematoasă

Propolisul poate fi aplicat intern sau extern în diferite afecțiuni inflamatorii. Acțiunea antiedematoasă este susținută de un complex de alte acțiuni: analgezică și anestezică.

Diferite preparate pe bază de propolis sunt aplicate pentru diferite procese inflamatorii acute sau cronice ale urechii medii, condiții infecțioase și toxice ale membranei meningeale și ale gingiilor.

Acțiunea anestezică locală și generală

Propolisul este unul dintre produsele care s-a dovedit a fi un foarte bun agent anestezic.

În aplicații locale el prezintă o activitate de 3,5 ori mai mare decât a cocainei și de 5,2 ori mai mare decât a procainei (GHISALBERTI, 1979) [7].

În doze constând în 0,012 g/kg corp, el produce la animale o anestezie generală ce poate dura 45 minute. Aplicat oral, în chirurgia veterinară (la oi și câini) efectul anestezic se instalează în 2-5 minute iar animalele nu prezintă modificări de puls, respirație și temperatură și nici dispariția excitabilității de reflex.

Alte acțiuni ale propolisului: radioprotectoare, antiastmatică

Studiile au arătat că soluții radioopace de propolis pot fi aplicate în tratamente topice (unguent de propolis cu lanolină) pentru prevenirea apariției radiodermitelor datorate terapiei cu raze X sau radioterapiei în tratamentul cancerului. Produsele farmaceutice pe bază de propolis pot accelera vindecarea leziunilor produse de aceste tipuri de terapii.

Propolisul s-a dovedit de asemenea un excelent mijloc de tratament al astmului bronșic, a tulburărilor neuro-psihiice etc. Rărirea sau încetarea atacurilor de astm se datoresc unui complex de acțiuni:

- anestezică
- antialergică
- antiinflamatoare
- eutrofică locală
- imunostimulatoare
- creștere a secreției endogene de cortizol (în limite fiziologice) printr-o hipertonie globală, lentă, minoră, hipotalamo-hipofizară.

În tulburările neuro-psihiice (sindromul de stress, astenie, migrenă și restaurarea echilibrului somn-veghe, scleroză multiplă (scleroza în plăci), distrofie musculară progresivă, boala Parkinson, sindromul subiectiv de traumatism cranian, anorexie mentală) propolisul s-a dovedit de asemenea a avea efecte benefice.

Extracțele apoase de propolis sunt dovedite a avea un puternic efect asupra sistemului nervos autonom cu acțiune periferică asupra transmiterii influxului nervos și vasodilatație la nivelul rețelei sanguine.

Forme de aplicare a propolisului în diferite tratamente

Așa cum s-a menționat anterior există deja diferite forme de prezentare pentru produsele pe bază de propolis.

Începând cu suplimentele alimentare sau băuturi tonice, propolisul poate fi introdus în diferite formule.

Produsele farmaceutice (tablete, unguente, aerosoli, soluții, spray-uri, capsule, emulsii, suspensii, instilații pentru nas și ochi, supozitoare, ovule, pansamente etc.) pot fi obținute folosind fie tincturi, extracte alcoolice (extract fluid, extract spiss) sau extracte hidrosolubile de propolis, etc.

Propolisul poate fi utilizat și în forma sa naturală, ca produs brut, cu condiția ca impuritățile să fie îndepărtate cu atenție. Mulți apicultori care sunt obișnuiți cu propolisul, mestecă bucăți mici de produs brut. Oamenii din epoca noastră care sunt puși față în față cu dezvoltarea societății și ritmul vieții moderne sunt din păcate forțați să utilizeze produse mai ușor de administrat – capsule, tablete, spray-uri, etc.

Propolisul poate fi de asemenea utilizat în asociere cu alte produse farmaceutice, dietetice sau cosmetice, care în anumite cazuri poate îmbunătăți efectele terapeutice ale acestora.

Acesta este principalul motiv pentru care mulți cercetători încearcă să dezvolte noi metode de extracție, preparare, analiză și conservare a propolisului pentru a-i standardiza acțiunile la nivel biologic și pentru a putea utiliza acest produs, beneficiind de efectele sale terapeutice.

De fapt, aceasta este singura condiție prin care propolisul poate penetra în producția de farmaceutice cu eficacitate uniformă și constantă și poate deveni un mijloc valoros între terapeuticele naturale.

Concluzii

Propolisul a devenit în ultimele decenii unul dintre produsele majore ale stupului, el fiind utilizat pe scară largă în medicina tradițională.

Studiile asupra compoziției sale au relevat o mare diversitate de compuși cu acțiune biologică însemnată la nivelul organismului uman. Totuși, compoziția chimică a propolisului nu este constantă și nici reproductibilă, ea variind în funcție de zona geografică și de sursa vegetală vizitată de albine pentru colectarea materiilor prime din care este produs.

Diversitatea de compoziție chimică presupune așa cum s-a arătat și găsirea unor solvenți specifici pentru grupele de compuși cu acțiune biologică și farmacoterapeutică.

Primele încercări de solventare au pornit tot de la activitatea din apicultură, unde practicianul a constatat că petele de mâini produse de contactul și aderența puternică a produsului pot fi eliminate prin folosirea de alcool sau produși petrolieri.

Studiile comparative efectuate cu diferiți solvenți organici : alcool metilic, alcool etilic, acetonă, propilen-glicol, dimetil-sulfoxid au relevat solubilități diferite ale diferitelor eșantioane de propolis prelevate din diferite regiuni geobotanice. Oricum în toate eșantioanele de propolis studiate componenții predominanți sunt compuși flavonoizi (flavone, flavanone, flavonoli), acizi fenolici și derivați ai acestora – compuși care și-au demonstrat acțiunea biologică puternică în experimente de laborator și clinice.

Între toți solvenții menționați se pare că cel mai activ și care a fost adoptat de lumea științifică pentru majoritatea studiilor fundamentale este alcoolul etilic și acesta folosit în diferite concentrații pentru prepararea de diferite tipuri de tincturi, extracte, soluții hidroalcoolice, aceasta în mod deosebit pentru aplicațiile interne.

Pentru aplicațiile externe, gama de solvenți specifici cuprinde atât alcoolul etilic cât și propilen-glicol, DMSO , etc.

Conform părerilor specialiștilor japonezi, pentru propolisul de proveniență braziliană – cea mai bună solventare a fost oferită de o soluție alcoolică de 80% - rezultate exprimate prin spectrele de absorbție în UV și absorbanta maximă obținută la lungimea de undă de 290 nm, știut fiind faptul că majoritatea compușilor flavonoizi absorb în acest domeniu spectral.

Eficiența solvenților de extracție a fost verificată și prin studii asupra acțiunii antioxidante a extractelor de propolis obținute. Și în acest caz se pare că alcoolul etilic oferă cele mai relevante valori.

Marea diversitate de extracte de propolis obținute în diferite laboratoare ale lumii a fost riguros testată pentru identificarea acțiunilor biologice specifice. Și aceste studii au fost determinate tot de evidența rezultatelor obținute empiric în medicina tradițională din diferite regiuni ale lumii.

Extractele de propolis, dar mai ales fracțiunile active ale acestui produs – flavonoizii, compușii quinonici etc.- prezintă o paletă foarte largă de acțiuni între se pot menționa:

- acțiunea bacteriostatică și bactericidă
- acțiunea antialergică dar paradoxal și alergenă
- acțiunea antivirală și antifungică
- acțiunea antixidantă
- acțiunea imunomodulatoare (propolisul acționează ca un stimulent nespecific dar și specific al sistemului imunitar, deci ca o substanță de BRM – biological response modifier (modificador al răspunsului biologic)
- acțiunea citotoxică și antitumorală
- acțiunea cicatrizantă și epitelizantă

și spectrul de acțiuni se poate detalia ca rezultat al acestor acțiuni principale, la diferite niveluri ale organismului uman.

Evidențierea proprietăților biologice și terapeutice ale propolisului a condus la căutarea și realizarea unor soluții tehnologice originale de obținere a unor extracte standardizate cu aplicativitate în terapeutică. Marea lor majoritate de bazează pe realizarea unor extracte alcoolice concentrate în principii active prin aplicarea unor tehnologii blânde, neagresive care să permită utilizarea fracțiunilor active în diferite aplicații terapeutice. Problema majoră a extractelor de propolis rămâne însă la nivel mondial găsirea unor soluții de standardizare a produsului.

Standardizarea propolisului este însă, la ora actuală o misiune destul de dificilă, având în vedere diversitatea compozițională a produsului. Încercările de standardizare în funcție de originea geobotanică reprezintă un astfel de parametru, dar nici acesta nu oferă un maxim de reproductibilitate a rezultatelor, deoarece și aici se produc variații climatice, sezoniere, ponderea unor anumite specii vegetale, etc. Totuși o caracterizare conform originii geobotanice reprezintă un parametru de

pornire de la care se pot aprofunda studiile pentru caracterizarea componentei biochimice cu acțiune biologică.

Având în vedere sinergismele de acțiune dintre diferitele grupe de compuși prezenți în produs, acțiunea biologică ar putea constitui un parametru deosebit de important indiferent de originea geografică. Un exemplu în acest sens îl constituie acțiunea antibacteriană și antivirală a produsului recoltat atât din zona de climat temperat (Europa și Asia) dar și a celui recoltat din zone tropicale și sub-tropicale (cazul diferitelor tipuri de propolis cubanez a căror compoziție este complet diferită de cea a diferitelor alte tipuri de propolis european sau asiatic). Deasemenea, acțiunea anti-tumorală se pare că este foarte specifică și puternică pentru diferitele tipuri de propolis brazilian în care compuși de tipul artepilinei C și a clerodan-diterpenoidului acționează în diferite tipuri de tumori, fără însă a neglija acțiunea esterului fenetic al acidului cafeic și ai altor derivați ai acidului cafeic (esteri de tipul CAPE), compuși specifici propolisului din zonele europene și asiatice.

Studiile viitoare ce stau în atenția specialiștilor în domeniul nutriției și terapeutice au oricum ca scop principal găsirea unor soluții pentru standardizarea și fundamentarea introducerii acestui valoros produs apicol în consumul uman sub formă de suplimente alimentare cu rol de întreținere a sănătății (profilaxie) dar și în practica medicală curentă, alternativă naturală lipsită de efectele nocive sau secundare produse uneori de chimioterapia unor afecțiuni.

Bibliografie

1. PHILLIPS, E.F. – (1953) – *Beekeeping*, The Macmillan Co., N.Y.
2. BROTHER ADAM – (1964) – In Search of the Best Strains of Bee. Concluding Journeys, *Bee World* **45** : 70-83; 104-118.
3. ROSCH, F., in ERWIN C. ALFONSUS- (1933) – Some sources of propolis, *Gleans. In Bee Culture*, **61**: 92-103.
4. KUSTENMACHER, H., (1911) – Propolis, *Ber.dt.Pharm.Ges.*, **21**(1): 65-92.
5. HAYDAK, M.H., (1953) – Propolis. Report of the Iowa State Apiarist, *Publ.: Des Moines. State of Iowa*, p.74-87 (B.CA 50:3660f).
6. EVENIUS citat în Propolis – a remarkable hive product, *Editura Apimondia*, 1975, București.
7. GHISALBERTI, E.L., (1979) – Propolis: a review, *Bee World*, **60**(2): 59-84.
8. KONIG, B., (1985) – Plant sources of propolis, *Bee World*, **66**(4):136-139.
9. MARIN, M., VELESCU, G., (1975) – in Propolis – a remarkable hive product, *Ed. Apimondia*, București.
10. RICCIARDELI D'ALBORE (1979) – L'origine géographique de la propolis ; *Apidologie*, **10**(3): 241-243.
11. HEGAZI, A.G., (1998) – Propolis – a review, *Bee Informed*, **5**(2,3): 5, 22-23, 6-7, 23-28.

12. POPRAVKO, S.A., (1975) – Chemical composition of propolis, its origin and problems of standardization, in *Propolis – a remarkable hive product*, Ed. Apimondia, București.
13. OPRIS, T., (1990) – Uimitorii producători ai naturii, Ed. Ion Creangă, București, 128 pagini, ISBN 973-25-0197-9, Rășinile.
14. GREENAWAY, W., SAYSBROOK, T., WHATLEY, F.R., (1990)- The composition and plant origins of propolis. A report of work at Oxford., *Bee World*, **71**(3): 107-118.
15. WALKER, P., CRANE, E., (1987) – Constituents of propolis, *Apidologie*, **18**(4):327-334.
16. MAKASHVILI, Z.A., (1978) – The characteristics of Georgian propolis, First Symposium on Propolis, Bratislava – Propolis- a remarkable hive product, *Apimondia Publishing House*, Bucharest.
17. PAPAY, V., TOT, L., SOLTESZ, M., et al., (1985) – The pharmacological activities of the fractions and the compounds isolated from Hungarian propolis and *Populus gemma*, The XXX-th International Congress of Apimondia, Nagoya, Japan, 453-456.
18. DONADIEU, Y., (1994) – Un médicament naturel essentiel : La propolis (2) , *Abeilles et fleurs*, 424: 5-6.
19. POLINICENCU, C., NISTOR, C., POLINICENCU, M., POPESCU, H., (1981) – *Clujul Med.*, **54**(2): 166-168
20. JAUBERT, G.T., (1927) – *Compt.Rend.Acad.Sci.*, 184, 1134.
21. PERRAULT, (1976) – *The Merck Index*, Vinth Ed. Rahway, New York, USA.
22. VILLANUEVA, V.R., BARBIER, M., GONNET, M., LAVIE, P., (1964) – Sur l'isolement et l'identification de la 3,5,7-trihydroxy flavone à partir de la propolis , *Annales de l'Institut Pasteur* ; **106**: 292-302.
23. EGGER, K., TISSUT, M., (1969) – Sur la présence de la galangine, pinocembrine et isalpinine dans les bourgeons de *Populus nigra* L., in *Compt.Rend. Acad. Sci.*, 267, 1329.
24. ERDTMAN, H., NOVOTNY, L., ROMANUK, M., (1966) – *Tetrahedron*, **22**, Suppl., (8), 1, 71 – *Farmacopeea Română*, Ed. Med. București, 1976, Ed. IX.
25. SCHNEIDEWIND, E.M., BUGÉ, A., KALA, H., METZNER, J., ZSCHUNKE, A., (1979) – Identification of an antimicrobially active constituent isolated from propolis (author's translation) (Identifizierung eines aus Propolis isolierten, antimikrobielle wirksamen Inhaltsstoffes), in *Pharmazie*, **34**(2): 103-106.
26. POPRAVKO, S.A., (1969) – Isolation and identification of basic components of propolis, *XXXII-nd International Congress of Apimondia*, Munich, Germany
27. METZNER, J., BEKEMEIER, H., SCHNEIDEWIND, E., SCHWAIBERGER, R., (1975) – Bioautographic detection of the anti-microbial active constituents of propolis, *Pharmazie*, **30**(2): 799-800.

28. PERKIN, W., HUMMEL, H., (1896) in 1902 – *Journal of Chem, Soc.*, **81**: 585-587.
29. BUDAVARI, S., (1989) – in Merck Index, *Merck &Co., Rahway, N.J.*
30. KARDAKOV, V.P., (1980) – Propolis, aminoacids and European foul brood, *Tekhnol.Proizvod.Prod.Pcelovodstvo*, pp. 151-153.
31. GABRYS, J., KROL, W., SCHELLER, S., SHANI, J., (1986) – Free aminoacids in bee hive product (propolis) as identified and quantified by gas-liquid chromatography, *Pharmacol.-Res.-Commun.*, Jun. **18**(6): 513-518.
32. VANHAELEN, M., VANHAELEN-FRASTRE (1979) – Propolis II: Identification by high-performance chromatography (liquid, gas-liquid and thin layer) of the constituents. Bioautography of the chromatograms of the anti-bacterial constituents. *J.Pharm.Belg.*, Nov-Dec., **34**(6): 253-259.
33. BRĂILEANU, C., MOTOCESCU, R., BAZAVAN, E., BĂLAN, E., (1978) – în vol. *Comunicări prezentate la primul simpozion al medicamentului românesc*, Ed.Medicală, București, pp.634.
34. METZNER, J., BEKEMEIER, H., SCHNEIDEWIND, E.M., FRIEDERICH, E., (1977) – Zur Wirkung von Propolis und Pinocembrin auf Sprosspilze. *Pharmazie*, **32**: 730-733.
35. METZNER, J., SCHNEIDEWIND, E.M., (1978) – Studies on the question of potentiating effects of propolis constituents. *Pharmazie*, Jul. **33**(7): 465-468.
36. POLINICENCU, C., LEUCUȚA, S., POPESCU, H., TAMAȘ, M., (1984) – *Symposium Flavonoidae*, 1 iunie 1984, Cluj-Napoca, pp.60.
37. POPESCU, H., GIURGEA, R., POLINICENCU, C., (1985) – Extractul standardizat de propolis și medicamentele Candiflor – *Centrala industrială de medicamente, cosmetice, coloranți și lacuri*, București.
38. PALOȘ, E., PETRE, N., ANDREI, C., (1975) - Tehnologia de obținere a extractului moale de propolis, *Propolis- a remarkable hive product*, Editura Apimondia, București.
39. OIȚĂ, N., BAIDAN, N., PALOȘ, E., POPESCU, F., (1981) – Produsele apicole în oftalmologie, *România Apicolă*, nr.8.
40. BANKOVA, V.S., POPOV, S.S., MAREKOV, N.L., (1982) – High performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis, *Journal of Chromatography*, **242**(1):135-143.
41. ABD EL HADY, F.K., HEGAZI, A.G., (1994) – Gas chromatography – mass spectrometry (GC/MS) study of the Egyptian propolis I – aliphatic, phenolic acids and their esters. *Egypt.J.Appl.Aci.*, **9**, 749-760.
42. ABD EL HADY, F.K., (1994) – Gas chromatography – mass spectrometry (GC/MS) study of the Egyptian propolis 2 – Flavonoid constituents. *Egypt.J.Appl.Sci.*, **9**(8): 91-109.
43. PARK, Y.K., KOO, M.H., IKEGAKI, M., (1998) – *Current Microbiology*, **36**, 24-28.

44. MATSUSHIGE, K., BASNET,P., HASE,K., KADOTA,S., TANAKA,K., NAMBA,T., (1996) – Propolis protects pancreatic beta-cells against the toxicity of streptozotocin (STZ) – *Phytomedicine*, vol.III.(2), pp. 203-209.
45. MARKHAM, K.R., (1982) – In *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, pp. 36-51.
46. KUNO, K., (1987) – Analysis of propolis and its quality evaluation in *Fragrance J.*, **83**: 36-39.
47. JURD, L., GEISSMAN, T.A., (1956) – *J.Org.Chem.*, **21**, 1395-1401.
48. PORTER,L.J., MARKHAM, K.R., (1970) – *Phytochemistry*, **9**, 1363 – 1365.
49. MIYATAKA, H., NISHIKI,H., MATSUMOTO,H., FIJIMOTO,T., MATSUKA, M., SATOH,T., (1997) – *Biol.Pharm.Bull.*, **20**: 496-501.
50. NELSON-M., GONZALES,R., GONZALES,A., REMIREZ, D., (1996) – Histopathological evaluation on the Effect of Red propolis on liver damage induced by CCl₄ in rats – *Arch.Med.Res.*, **27**(3):285-289.
51. BASNET, P., MATSUSHIGE,K., HASE,K., KADOTA, S., NAMBA,T., (1996) – Potent antihepatotoxic activity of dicaffeoyl quinic acids from propolis- *Biol.Pharm.Bull.*, **19**(4): 655-657.
52. KLIMMEK, E.W., (1988) – *Propolis und Bienengift – Eine Herausforderung an die Medizinische Wissenschaft*, Frechen: 1-68.
53. HAUSEN, B.M., WOLLENWEBER,E., SENFF,H., POST,B., (1987)- Propolis allergy (I) – Origin, properties and usage and literature review, *Contact Dermatitis*, sept., **17**(3): 163-170.
54. SCHULER, T.M., FROSCH, P., (1988) – *J.Hautarzt*, **39**, 139-142.
55. ITOH,K., AMAMIYA,I.,IKEDA, K., KONISHI, M., (1994) – *Honeybee Science*, **15**, 171-173.
56. DEBIAGGI,M., TATEO,F.,PAGANI,L., LUINI,M., ROMERO,E., (1990) – Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication, *Microbiologica*, **13**(3): 207-213.
57. CHENG, P.C., WONG, G., (1996) – Honey bee propolis: prospects in medicine, *Bee World*, **77**(1): 8-15.
58. AMOROS, M., SAUVAGER,F., GIRRE, L., CORMIER, M., (1992) – *In vitro* antiviral activity of propolis, *Apidologie*, **23**(3): 231-240.
59. AMOROS, M., SIMOES, C.M.O., GIRRE, L., (1992) – Synergistic effect of flavones and flavonols against Herpes simplex virus type I in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products*, **55**(12): 1732-1740.
60. MORFEI, A., BURDUCEA, O., NEUMAN,R., CAJAL,N., COPELOVICI, Y., CRIȘAN, I., (1980) – Investigations concerning the action of several chemical and biological agents on HBAG – *Rev.Roum.Med.-Virol.*, **31**(4): 273-278.
61. MATSUNO, T., (1991) – Anti-tumoral effect of 3 substances isolated from propolis (quercetin, caffeic acid phenetyléster and a diterpenoid of clerodane, - *The 50-th annual Reunion of the Cancer Japanese Society*.

62. MATSUNO, T., (1992) – On cancer cellcidal activities of propolis, *14-th meeting of Honeybee Science Inst.of Tamagawa Univ.*, Anti-tumor properties of propolis, *51-th Japan Cancer Society Conference*.
63. ARAI, S., et al., (1993) – Effects of propolis on colon cancer – *Honeybee Science*, **15**(4): 155-162 (1994).
64. KIMOTO, T., (1995) – Antitumor activities and its clinical application by artepillin-C isolated from propolis. – *Nippon Iji Shinpo*, 3726: 43-48.
65. KIMOTO, T., (1998) – Apoptosis and Suppression of Tumor Growth bz Artepillin C extracted from Brazilian propolis – *Cancer Detection and Prevention*, **22**(6): 506-515.
66. MARCUCCI, M.C., (1995) – Propolis chemical composition, biological properties and therapeutic activity – *Apidologie*, **26**, 83-99.
67. MATSUNO, T., - (1995) – *Z. Naturforsch.*, 50 c, 93-97.
68. MATSUNO, T., SUGA, S., TAKANO, H., MATSUMOTO, Y., MOROKAWA, J., - (1996) - *Chem. Abstr.*, **124**, 194307c.
69. MATSUNO, T., MATSUMOTO, Y., MOROKAWA, J., SAITOM., (1997) – *Chem. Abstr.*, **127**, 39814j.
70. GRANGE, J.M., DAVEY, R.W., (1990) – Antibacterial properties of propolis (bee glue) – *Journal of the Royal Society of Medicine*, **83**(3): 159-160.
71. SIMUTH, J., TRNOVSKY, J., JELOKOVA, J., - (1996) – Inhibition of bacterial DNA-dependent RNA polymerases and restriction endonucleases by UV-absorbing components of propolis. *Pharmazie*, **41**: 131-132.
72. BRUMFITT, W., HAMILTON-MILLER, J.M., FRANKLIN, T., (1990) – Antibiotic activity of natural products: I. Propolis., *Microbios*, **62**(250): 19-22
73. DOBROWOLSKI, J.W., VOHORA, S.B., și col., (1991) – Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. *Apidologie*, **22**(2): 155-162.
74. GRUNBERGER, D., BANERJEE, R., EISINGER, K., et al., (1988) – Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenetyl ester isolated from propolis. *Experientia*, **44**(3): 230-232.
75. SU, Z.Z., GRUNBERGER, D., FISHER, P.B., (1991) – Suppression of adenovirus type 5 EIA mediated transformation and expression of the transformed phenotype by caffeic acid phenetyl ester (CAPE) – *Mol. Carcinogen.*, **4**: 231-242.
76. GUARINI, L., SU, Z.Z., ZUCKER, S., LIN, J., GRUNBERGER, D., FISHER, P.B., (1992) – Growth inhibition and modulation of antigenic phenotype in human melanoma and glioblastoma multiforme cells by caffeic acid phenetyl ester (CAPE). *Cellular and Molecular Biology*, **38**(5): 513-527.
77. RAO, C.V., DESAI, D., KAUL, B., et al., (1992) – Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. *Chemical and Biological Interactions*, **84**: 277-290.

78. RODRIGUEZ, S., ANCHETA, O., RAMOS, M.E., et al., (1997) – Effects of Cuban Red propolis on galactoseamine-induced hepatitis in rats – *Pharmacological Research*, **35**(1): 1-4.
79. KROL, W., CZUBA, Z., SCHELLER, S., GABRYS, J., (1990) – Antioxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemoluminescence oxidation of luminol. – *Biochem. Int.*, **21**(4):593.
80. HERMANN ,G.R., BRACAMONTE, J.A., (1990) – Propolis extract as a sunscreen agent. *Drug and Cosmetic Industry*, **147**(4): 38.
81. LIN ,S.C., Y.H.LIN, C.F.CHEN, (1997) – The Hepatoprotective and Therapeutic Effects of Propolis Ethanol extract on Chronic Alcohol - Induced Liver Injuries, *American Journal of Chinese Medicine*, **XXV** (3-4), pp. 325-332.
82. BASNET,P., MATSUSHIGE, K., HASE,K., (1996) – Potent antihepatotoxic activity of dicaffeoyl quinic acids from propolis, *Biol.Pharm. Bull.*, **19** (4): 655-657.
83. BASNET, P., MTASUSHIGE, K., HASE, K., (1996) – Four Di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biol.Phaarm.Bull.*, **19**(11): 1479-1484.
84. MARKHAM, K.R., MITCHELL, K.A., WILKINS,A.L., (1996) – *Phytochemistry*, **42**: 205-211.
85. GIURGEA, R., RUSU, M.A., COPREAN, D., POPESCU, H., POLINICENCU, C., (1987) – Biochemical effects of standardized propolis extract (SPE) and of sylimarin on the liver of ethyl alcohol intoxicated rats – *Agressologie*, **28** (8): 831-833.
86. RABINOVITCH, A., (1994) – Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM: therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes*, **43**: 613-621.
87. YAMAUCHI, R., KATO,K., OIDA, S., KANAEDA, J., UENO,Y., (1992) – Benzylcaffeate, an antioxidative compound isolated from propolis. *Biosci.Biotech.Biochem.*, **56**:1321-1322.
88. TURK,J., CORBETT, J.A., RAMANADHAM, S., BOHRER, A., MCDANIEL, M.L., (1993) – Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem.Biophys. Res. Comm.*, **197**: 1458-1464.
89. UCHIGATA, Y., YAMAMOTO, H., KAWAMURA, A., OKAMOTO, H., (1982) – Protection by superoxide dismutase, catalase and poly (ADP) ribose synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J.Biol.Chem.*, **257**: 6084-6088.
90. MATSUSHIGE, K., KUSUMOTO, I.T., (1995) – Quality evaluation of propolis. 1. A comparative study on radical scavenging effects of propolis on vespaie nidus. *J.Trad.Med.*, **12**:45-53.