

Activitatea antimicrobiană a unui extract de propolis The antimicrobial activity of a propolis extract

Dumitrescu E., Harfas C., Kraunovic M.C., Orășan-Alic A.S., Moruzi R.F., Mohamed A.E.,
Doma A.O., Muselin F., Cristina R.T.

eugeniadumitrescu@usab-tm.ro

Cuvinte cheie: Propolis, compuși polifenolici, spectrofotometrie, LC-MS, activitate antimicrobiană.

Key words: Propolis, polyphenolic compounds, spectrophotometry, LC-MS, antimicrobial activity

Rezumat

Propolisul, alături de miere, lăptișor de matcă, polen, păstură, este un produs ale cărui proprietăți profilactice și terapeutice sunt cunoscute și utilizate în medicina populară din cele mai vechi timpuri. Propolisul este de fapt denumirea generică pentru substanța rășinoasă colectată de albinele melifere din diferite surse vegetale. Este fabricat de albine pentru a apăra colonia sub raport fizic, chimic și biologic. Obiectivele cercetării au fost: Determinarea polifenolilor totali prin spectrometrie în UV-VIS, Determinarea conținutului total de flavonoide prin metoda colorimetrică și Identificarea polifenolilor individuali din extractul de propolis. Analiza LC-MS a extractului de propolis a fost realizată în cadrul Platformei de Cercetare Interdisciplinară

Abstract

Propolis, along with honey, royal jelly, pollen, pasture, is a product whose prophylactic and therapeutic properties are known and used in folk medicine since ancient times. Propolis is actually the generic name for the resinous substance collected by honey bees from various plant sources. It is made by bees to defend the colony physically, chemically and biologically. The objectives of the research were: Determination of total polyphenols by UV-VIS spectrometry, Determination of the total flavonoid content by colorimetric method and Identification of individual polyphenols in propolis extract. LC-MS analysis of propolis extract was performed within the Interdisciplinary Research Platform

1. Propolisul în terapie

Compoziția biochimică a propolisului îi conferă virtuți terapeutice de neegalat. Conține polen, rășina, ceară, aminoacizi, lipide, zaharuri, uleiuri volatile, acizi organici și aromatici (acizii cinamic, cafeic, ferulic), activi contra organismelor Gram-pozitive și Gram-negative.

De asemenea, are în compoziție vitamine (provitamina A, vitaminele B, C, E, PP), minerale (fier, cupru, zinc, siliciu, calciu, magneziu), flavonoide (quercitina cu rol antioxidant), hormoni vegetali, enzime și substanțe cu rol antibiotic.

Dezvoltarea societății umane a permis cunoașterea unor resurse naturale deosebit de valoroase în produsele albinelor (Fig. 1).

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 [5].



Figura 1. Hieroglifa din Egiptul Antic

Sursa: <https://koreanskincaretips.com/benefits-of-propolis-on-skin/>

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. Dintre acestea, propolisul reprezintă la ora actuală una din cele mai puternice provocări pentru lumea nutriționiștilor și cea medicală [18].

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 îmbalsămarea a cadavrelor.

Faptul că propolisul era cunoscut și de grecii antici este dovedit de însăși denumirea greacă a produsului: *pro* (înaintea), *polis* (cetate) [24].

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. Albinelile 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 albinelile 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* [23].

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 IbnSina (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 albinelile cresc puieții și depozitează mierea; ceara neagră este partea de debrisuri din stup. Este foarte clar că ceara neagră nu este altceva decât propolisul [32].

2. Clasificarea produselor apicole

Numeroși autori au analizat tipurile de produse apicole [5, 8, 9, 21, 29, 32].

Principalele clase de produse apicole sunt:

Mierea este produsul realizat de albine în exclusivitate din nectarul florilor sau din sucurile dulci de pe alte părți ale plantelor verzi, pe care acestea le culeg, le îmbogățesc cu substanțe proprii și le prelucurează într-un mod specific obținând produsul astfel definit, pe care-l depozitează în celulele fagurilor din stup pentru a constitui hrana lor energetică.

După proveniența materiei prime mierea poate fi de origine:

- *vegetală (mierea de flori):*
- *monofloră (salcâm, tei, floarea soarelui, mentă, zmeură etc.);*
- *polifloră (sezonieră, asociată de la numeroase plante cu flori).*
- *animală (mierea de mană).*

Ceara secretată de glandele cerigene ale albinelor lucrătoare în vârstă de 13-18 zile.

În momentul secreției, ceara este lichidă și în contact cu aerul se solidifică sub forma unor solzișori albi străvezii, foarte mici, care după un anumit timp se închid la culoare devenind galbeni [5,33].

Ceara de albine (produsă de *Apis mellifera L.*) se clasifică în:

- *ceară de stupină;*
- *ceară de presă;*
- *ceară extractivă.*

Lăptișorul de matcă, o secreție a glandelor faringiene și mandibulare ale albinelor lucrătoare, folosită de către ele pentru hrănirea larvelor în primele 3 zile, a larvelor de matcă pe toată perioada până la căpăcire cât și a mătcilor.

Polenul și păstura. Polenul este colectat de albinelile culegătoare de la plantele polenifere sau nectaro-polenifere și depozitat de către acestea în celulele fagurilor din stup, constituind păstura, care reprezintă partea proteică necesară hrănirii familiei de albine și a puieții.

Transformarea polenului în păstură este legat de procesul natural de conservare a

polenului care, în urma unor procese biochimice de tip fermentativ sub acțiunea anumitor microorganisme, devine păstură.

Propolisul, care este denumirea generică pentru substanța rășinoasă colectată de către albinele melifere din diferite surse vegetale.

Veninul, este un amestec al secreției glandelor de venin ale albinelor lucrătoare, fiind stocat în punga de venin și eliminat la exterior în momentul înțepării.

Apilarnilul, un produs apicol obținut din larvele de trântori și din conținutul nutritiv aflat în celulele respective din faguri.

3.1. Descrierea propolisului

Cuvântul propolis derivă din grecescul *pro* = pentru (sau în apărarea) și *polis* = cetate, ceea ce înseamnă apărarea cetății (în acest caz, a stupului) (Fig. 2).

De asemenea se poate lua în considerare și o altă etimologie a acestui cuvânt, atribuindu-i o origine latină (termenul este folosit de Pliniu) [19].



Figura 2. Granule de propolis

Sursa: <https://www.csid.ro/sanatate/medicina-alternativa/>

Construcția cuvântului provine din asamblarea prefixului *pro* cu semnificația “în scopul, favorabil pentru” și *polis*, o formă de conjugare a verbului *polire* (*polir* în franceză) = a acoperi, a polei și prin deformare *lisser* = a netezi.

Propolisul desemnează o întreagă serie de substanțe rășinoase, gumate și balsamice

cu consistență vâscoasă, adunate de pe diferite părți (muguri și scoarță, în special) ale vegetalelor (mai ales anumite pomi) de către albine care le aduc în stup și le modifică prin aportul unor secreții proprii (ceară și secreții salivare în principal) [5, 2, 22].

Albinele folosesc propolisul ca material “plastic” cu ajutorul căruia efectuează chitirea crăpăturilor (mai mici de 3-5 mm) și netezirea suprafețelor rugoase din interiorul stupului, fixarea și consolidarea fagurilor, lustruirea celulelor în special a celor din fagurii vechi în care s-au crescut mai multe generații de puiet, precum și pentru acoperirea și îmbălsămarea dăunătorilor mari pătrunși în stup pe care-i omoară dar nu-i pot evacua.

În afara rolului plastic, propolisul constituie mijlocul de igienizare și dezinfectare a microclimatului din stup.

3.1.1. Proveniența propolisului

În privința provenienței propolisului există teorii care-i confirmă dubla origine:

Originea internă

Propolisul este un reziduu rășinos provenit din prima fază a digestiei polenului, proces ce are loc într-un mic organ situat între gura și intestinul mediu (“*stomacul de polen*” sau “*chylus magen*”) [15, 30].

Învelișul exterior al grăunciorului de polen este transformat în balsam și regurgitat de către albină sub formă de picături depuse în stup. Prezența urmelor și fragmentelor de exină (stratul exterior de polen) în propolis a constituit un argument în acest sens.

Ca și contraargument, unii autori demonstrează că albinele închise într-o seră și aprovizionate cu polen din abundență nu au depus nici un pic de propolis [5].

O altă dovadă frapantă împotriva acestei teorii reiese din cazul unei stupine situate într-un loc în care vegetația este predominant alcătuită din *Populus balsamifera*.

Polenul acestei specii este recoltat primăvara, perioadă în care albinele îl consumă imediat, ori propolisul nu este recoltat de pe acest arbore decât la sfârșitul sezonului. Actualmente se acceptă că albinele

colectează propolisul din diferite surse vegetale din zonele temperate din nord.

Principalele specii lemnoase producătoare de propolis sunt:

- plopul (*Populus spp.*),
- fagul (*Betula spp.*),
- pinul (*Pinus spp.*),
- bradul (*Abies spp.*),
- prunul (*Prunus spp.*),
- salcia (*Salix spp.*),
- ulmul (*Ulmus spp.*),
- stejarul (*Quercus spp.*),
- castanul indian (*A. hippocastanum L.*),
- frasinul (*Fraxinus excelsior L.*),
- cireșul (*Prunus avium*) precum și
- floarea-soarelui (*Helianthus spp.*)[5].

Albinele vizitează probabil și alte specii pentru a recolta acest prețios material, dar acestea sunt încă departe de a putea fi total inventariate.

Propolisul găsit în stup nu are același aspect, aceeași consistență și nici același miros ca rășinile vegetale recoltate de albine și examinate după capturarea albinelor din zbor; acestea nu îl recoltează deci ca pe un produs finit și este posibil că albinele îi adaugă o serie de secreții salivare sau enzime, în același mod în care o fac pentru miere.

Stupii amplasați lângă sau în păduri propolizează mult mai mult decât cei situați în zonele de câmpie.

De asemenea, toamna și primăvara albinele propolizează mai mult decât în timpul verii. Polenul poate deține câteva procente, iar corpurile străine, o cantitate variabilă în funcție de atenția acordată operațiunilor de recoltare din stup [18, 33].

Impuritățile considerate normale sunt reprezentate de mici particule vegetale, recoltate de albine odată cu materia primă și de perișori de pe corpul albinelor, iar cele nedorite sunt particule lemnoase, alte impurități mecanice și fragmente din faguri, încorporate în propolis în timpul colectării lui din stup de către apicultori.

Principalele falsificări ale propolisului sunt cele cu ceară, cu rășină brută de conifere sau cu sacâz (colofoniu).

3.1.2. Producerea propolisului

Tendința de propolizare a albinelor este un caracter de rasă sau ecotip și depinde chiar de însușirile individuale ale unor familii de albine (Fig. 3) [5].

Speciile *Apis florea* și *Apis dorsata* nu folosesc propolisul, de asemenea unele rase din specia *Apis mellifera* ca *Apis mellifera Lamarki*, Albina românească (*Apis mellifera carpatica*) au tendință moderată de propolizare comparativ cu rase de albine cu tendințe mai pronunțate de propolizare cum sunt

- albina caucaziană (*A. mellifera caucasica*),
- albina sahariană (*A. mellifera sahariensis*),
- albina anatoliană (*A. mellifera anatolica*, *A. mellifera scutelata*) și altele.



Figura 3. Albine producătoare de propolis

Sursa: <https://www.csid.ro/sanatate/medicina-alternativa/>

Albinele identifică particula de rășină ce urmează a fi recoltată cu ajutorul antenelor, apoi cu mandibulele prind bucata respectivă, trag de ea și o întind sub forma unui fir subțire până se rupe.

Cu picioarele, acestea manevrează particula ruptă și o depozitează. Această operațiune se repetă până ce grăunciorii de propolis ajung la mărimea necesară.

În timpul prelucrării acestui material lipicios, albinele nu se încheiază cu el deoarece ele secretă o anumită substanță sau o serie de substanțe care le ajută să facă față acestei situații. La descărcarea lui albina este ajutată de alte albine, care trag și rup propolisul cu

mandibulele și îl depozitează acolo unde este nevoie.

Debarasarea de propolis se poate face adesea chiar pe scândura de zbor și poate dura mai multe ore. La operațiunea de recoltare și de descărcare a propolisului, limba nu este utilizată de către albine [5, 12].

Recoltarea propolisului se face numai la o temperatură ridicată, peste 20°C, când materia vâscoasă este moale și mai ușor de adunat și manevrat.

Odată cu scăderea temperaturii, albinele încetează recoltarea propolisului.

Albinele culegătoare de propolis sunt uneori mai tinere de 15 zile, sunt în număr redus și sunt specializate pentru această muncă; rar efectuează și alte operațiuni, dar sunt angajate și în activitatea de cimentare în interiorul stupului [5].

3.1.3. Recoltarea și păstrarea propolisului

Propolisul omogen, destinat valorificării, se recoltează în sezonul activ, adică la sfârșitul perioadei de înmugurire a fiecărei specii de plante sau a grupului de plante cu o anumită specificitate vegetativă, localizate în aceeași microzonă pedoclimatică.

Cantitatea de propolis ce se poate obține de la un stup variază de la o regiune la alta, putând fi de la 100 până la 400 grame.

Recoltarea propolisului pentru trebuințele omului se face prin răzuirea lui de pe rame, din goluri, de pe podișoare, spetezele ramelor sau cu ajutorul unor colectoare de propolis.

Răzuirea propolisului se execută cu dalta cu ajutorul unui cuțit sau cu racleți ascuțiți, având grijă să se obțină un produs cât mai curat, fără impurități.

Recoltarea se face de obicei cu ocazia controlului stupilor sau la fiecare perioadă de 15-20 zile, când temperatura mediului ambiant este de cel puțin 20°C.

Propolisul recoltat se va păstra în mici bulgări sferici ce se formează încă de la recoltare, înveliți în hârtie de staniol sau în pungii de material plastic, introduși apoi în lădițe bine căptușite cu hârtie cerată și păstrați într-un loc răcoros [5, 18, 33]

Se mai recomandă a se păstra în borcane de sticlă colorate, închise cu dop de sticlă rotat și apoi parafinate.

Propolisul trebuie să fie ferit de umezeală și de expunerea directă la razele soarelui sau alte surse de căldură. Se recomandă păstrarea propolisului la temperatura de maximum 20 °C, în încăperi aerisite, lipsite de umezeală și mirosuri străine.

Ambalarea, transportul și livrarea propolisului se face în pungii de plastic introduse în lădițe de lemn, cu o capacitate de 5-20 kg.

3.1.4. Proprietățile propolisului

Proprietăți organoleptice și fizice

Propolisul este de mai multe categorii:

- *propolisul obișnuit* provenit de la diferite plante sau
- *propolis polifit* și *propolis uniplant* sau *monofit*, recoltat de la o singură plantă (specie) sau de la un grup de plante localizat într-o anumită zonă pedoclimatică.

Prezentare și identificare

Propolisul este o substanță rășinoasă cu aspect lipicios și heterogen, are aspect de masă solidă de culoare brună-cafenie (mai închis sau mai deschis) sau cenușie-verzuie, iar în secțiune aspectul poate fi omogen sau marmorat (Fig. 4) [5].



Figura 4. Aspectul propolisului proaspăt

Sursa: <https://www.verywellhealth.com/>

Consistența propolisului este vâscoasă, lipicioasă, până la tare, casantă, iar frământat între degete lasă urme. El se înmoaie la temperatura de 30-37 °C, sub 15°C este dur și

fără miros, la 50-60 °C se topește, iar peste 78°C devine lichid.

Încălzit ușor în baia de apă se divide în două părți foarte distincte: una vâscoasă care se depune, cealaltă lichidă (ceara din propolis) care plutește la suprafață și este utilizată în mod diferit în apicultură.

Mirosul este plăcut, caracteristic, de rășini naturale și se apreciază organoleptic la temperatura camerei prin mirosirea unei bucăți întregi sau a unei probe luată cu burghiul din mijlocul acesteia [5, 18].

Gustul este plăcut, deseori iute, uneori amăru, ușor astringent, diferit în funcție de origine.

Densitatea este cuprinsă între 1,120-1,136, fiind parțial solubil în alcool, benzină, terebentină, acetonă, cloroform, eter, amoniac, benzen, tricloretilenă și doar un amestec adecvat al diferiților solvenți permite dizolvarea aproape în totalitate a componentelor săi.

Este insolubil în apă rece, dar este parțial solubil în ea folosind diferite procedee.

Solventul cel mai util pentru necesitățile practice este alcoolul etilic concentrat 95°.

O condiție este ca propolisul să fie pur, admitându-se impurități "abia vizibile cu ochiul liber". Puritatea se pune în evidență prin solubilizarea în alcool 95°.

Proprietăți fizico-chimice

Cercetările de specialitate evidențiază că propolisul are o compoziție biochimică complexă dar variabilă, în funcție de sursa vegetală din care produsul a fost colectat de către albine [2, 5, 12].

Analiza chimică a propolisului (efectuată prin metode de analiză de mare finețe: cromatografie în fază gazoasă cuplată cu spectrofotometrie de masă, electroforeză, spectrofotometrie în U.V.) a evidențiat următoarele componente:

- rășini,
- substanțe flavonoide
- ceară (componente majoritare);
- uleiurile volatile,
- taninuri,
- balsamuri,
- enzime,

- vitamine liposolubile,
- substanțe minerale (componente minoritare).

În propolis mai există și puține granule de polen și cantități variabile de impurități, iar zaharurile solubile și substanțele azotoase sunt în cantități total ne semnificative.

Proporția componentelor propolisului (identificându-se peste 149 de substanțe) este redată în **tab. 1**.

Tabelul 1
Proporția componentelor propolisului

Componentă	Proporția
Materii rășinoase și balsamuri	55 %
Ceară	30 %
Uleiuri eterice	10 %
Polen	5 %

Rășinile constituie fracțiunea majoritară și ele sunt alcătuite în cea mai mare parte din acizi monocarboxilici în stare liberă cu formula brută $C_{20}H_{30}O_2$ (acizi rezinici) de tipul acizilor abietici și pimarici [16, 17].

De asemenea, în compoziția rășinii din propolis s-au mai identificat:

- acizi aromatici în stare liberă și în cantități reduse:
 - acid benzoic, (rol în activitatea antibacteriană și antifungică a propolisului),
 - acid cinamic, acid cafeic, acid ferulic (cu acțiune specifică: bactericidă și bacteriostatică) [22, 25];
- substanțe cumarinice și terpenoidice (esculetol, scopoletol)
- aldehide aromatice, vanilină și izovanilină;
- esteri ai acizilor benzoic, cinamic, cumaric;
- alcoolii aromatici, alcool benzilic.

Se presupune că esterii aromatici au o contribuție importantă la acțiunea antimicrobiană a propolisului.

Prezența acizilor în stare liberă imprimă propolisului reacție chimică pronunțată acidă, net diferită de cea a cerii de albine.

Ceara, al doilea component al propolisului brut, are o dublă origine, deci este alcătuită din două fracțiuni:

- **fracțiune vegetală** constituită din ceara existentă în structura substanței cleioase de pe mugurii arborilor care reprezintă materia primă a propolisului.
- cea de-a doua fracțiune este alcătuită din **ceara propriu-zisă** pe care albinele o adaugă în procesul de transformare a materiei prime în propolis.

Se apreciază că proporția celor două fracțiuni din ceara propolisului este de 1:3.

Ceara din propolis (datorită originii) are altă compoziție și însușiri organoleptice și fizico-chimice (valorile principalilor indici) decât ceara de albine.

Consistența este relativ moale și lipicioasă, structura cristalină slab evidențiată, culoarea brună-maronie cu reflexe verzui și miros pronunțat aromat.

Ca și o componentă nevaloroasă, ceara este insolubilă în alcool la rece, deci pe această cale poate fi separată de celelalte componente valoroase. Substanțele flavonoide sunt abundent reprezentate în propolisul brut încât cantitativ ele ocupă locul imediat următor după rășini și ceara [30].

Alături de rășini și celelalte componente solubile în alcool, ele sunt socotite substanțe valoroase din punct de vedere terapeutic. În activitatea practică ele se extrag împreună și se utilizează sub formă de preparate diferite, cum ar fi tincturile. Calitățile propolisului brut sunt apreciate prin raportarea la un flavonoid, component al propolisului brut.

Literatura de specialitate internațională arată că în propolis există bine evidențiat cantitativ, un procent de 15-20 % de flavonoizi [16].

Aceleași date arată că în propolis nu este vorba doar de prezența unor flavone oarecare, ci în compoziția propolisului predomină un anumit tip, având cap de serie chrizina.

3.2. Acțiunea farmacologică a propolisului

Au fost luate în considerare diferite proprietăți naturale ale propolisului, inclusiv activitatea:

- antimicrobiană,
- antioxidantă,

- antitumorală,
- antivirală,
- antiinflamatoare,
- antibacteriană,
- anestezică,
- antifungică,
- antiprotozoarică,
- antihepatotoxică, și
- antiseptică [3, 10, 13, 14].

Activitatea antibacteriană *in vitro* a propolisului a fost studiată împotriva mai multor tipuri de bacterii Gram-pozitive și Gram-negative și a sinergismului între diferiții compuși din propolis, în principal galanginflavonoide și pinocembrin [4, 13, 21, 26].

De asemenea, caracteristicile antioxidante și antimicrobiene ale propolisului sunt extrem de importante pentru industria alimentară datorită potențialului său de a întârzia oxidarea lipidelor și, ca atare, de a crește durata de viață a produselor alimentare [15].

Toreti și col., [31] au raportat date cu privire la eficacitatea propolisului de plop împotriva microorganismelor gram-pozitive și Gram-negative, ca bacteriile multirezistente la medicamente (de exemplu *Staphylococcus aureus* rezistent la metilicină (MRSA).

Quercetina și o parte din derivatele sale au demonstrat eficacitate antibacteriană împotriva MRSA, *Staphylococcus epidermidis* și *S. aureus*. S-a dovedit, de asemenea, prin studii clinice că, potențialul antibacterian al propolisului este legat de numărul mare de compuși activi care se găsesc în el (peste 200 de substanțe) [29].

Flavonoidele, care sunt principalii polifenoli din propolis sunt afectați de sursă și mediul în care trăiește albina [31]. În cea mai mare parte, compoziția propolisului este inconsecventă din cauza varietății de specii de plante care se dezvoltă în jurul stupinei, din care albinele aduna exudatele necesare [3].

Constituenții primari prezenți în propolis sunt flavonoide, compuși fenolici, și amestecuri de materiale aromatice [10].

Propolisul este, de asemenea, bogat cu acid cinamic, care a prezentat o eficacitate puternică împotriva mai multor bacterii:

- *Bacillus spp.*,
- *Streptococcus pyrogenes*,
- *Aeromonas spp*
- *Micrococcus flavus*,
- *Pseudomonas aeruginosa*,
- *Yersinia ruckeri*,
- *Vibrio spp.*,
- *E. coli*,
- *Mycobacterium tuberculosis*;
- *Listeria monocytogenes* [37].

Flavonoidele din propolis prezintă activitate fungicidă împotriva *C. pelliculosa*, *C. parapsilosis* și *Pichia ohmeri*, *C. famata*, *C. glabrata* [33].

Alți autori au raportat că, constituenți ai propolisului cum ar fi:

- acetatul de 3-acetilpinobanksin,
- pinobanksin-3-acetatul,
- pinocembrina,
- acidul p-cumaric și
- acidul cafeic

care prezintă activitate antifungică împotriva *Mycobacteriilor*, *Candida*, *Trichophyton* și *Fusarium* [12].

Efectul antitumoral al propolisului se datorează funcției combinate a constituenților polifenolici precum acidul cafeic și compușii fenolici [29, 35, 36].

Conform multor studii din literatura de specialitate propolisul prezintă activitate antiprotozoară împotriva:

- *Leishmania donovani*,
- *Trypanosoma cruzi*,
- *Giardia lamblia*,
- *Trichomonas vaginalis*,
- *Toxoplasma gondii* și
- *G. duodenalis* [3, 12].

De asemenea, componentele propolisului au capacitatea terapeutică de repararea și regenerarea a țesuturilor lezate [18].

Acestea se datorează caracteristicilor sale imunomodulatoare, antiinflamatorii și antimicrobiene. Mai mult decât atât, prezența bioflavonoidelor, argininei, vitaminei C, provitaminei A, complexului B, împreună cu

unele minerale posedă proprietatea de vindecare a rănilor.

Crișan și col. [8], în urma rezultatelor experimentale, susțin existența unei activități antivirale semnificative a extractului de propolis asupra infecției cu VHS (Virusul Herpes Simplex) "in vitro". Acțiunea propolisului se manifestă printr-o scădere a titrului infectant al VHS, atât printr-o acțiune virulicidă cât și prin efecte inhibitorii asupra multiplicării VHS. Multiplicarea VHS se menține la un nivel scăzut, restabilindu-se după îndepărtarea propolisului din mediu.

Autorii sunt de părere că propolisul acționează nespecific, stimulând capacitatea celulară de apărare, emițându-se părerea că este posibil ca propolisul să inducă formarea de interferon.

Cristina și col. [6] într-un studiu pe diluții alcoolice 5-10% de propolis monofit și polifit al eficacității antimicrobiene comparative au arătat că tincturile de propolis au avut activitate bună asupra lui: *Micrococcus lysodeiteticus*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Corynebacterium equi*, *Proteus* și *Mycobacterium*. Această activitate a fost comparativă cu cea a: Rifampicinei, Cloramfenicolului, Penicilinei G potasice, Ampicilinei și Flumequinoromului.

Tincturile de propolis au avut activitate medie asupra lui: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* și *Listeria monocytogenes*, iar asupra genurilor *Salmonella* și *Escherichia (coli)*, acțiunea propolisului monofit sau polifit s-a dovedit a fi foarte slabă.

Proprietățile antalgice ale propolisului au fost obiectul a numeroase lucrări, autorii au studiat inițial efectul anestezic al acestui produs în soluții alcoolice asupra corneei de iepure. Ei au arătat, ca și alți autori, că efectul său era mai puternic decât acela al cocainei și mai cu seama decât acela al procainei [18].

S-a observat de asemenea efectul sinergic al propolisului și al procainei.

Cercetările privind toleranța animalelor față de propolis făcute de *Velescu și Marin* (50) au relevat că administrarea orală la câine a câte 100 ml emulsie de propolis (alcool 10%) timp de 10-20 zile, nu modifică starea generală a animalelor.

După sacrificare nu s-au constatat modificări ale mucoaselor digestive și urinare, iar ficatul și rinichii au avut aspect normal.

Un rol important în izolarea și identificarea principalilor componenți din compoziția propolisului l-a avut Popravko [24].

Mai jos sunt prezentate componentele principale identificate în propolis, care formează cel puțin 1/3 din această substanță, dizolvată în alcool. Principalele componente ale propolisului sunt cele de tip flavonoid, mai ales flavone, flavonoli și flavonone (Fig. 5).

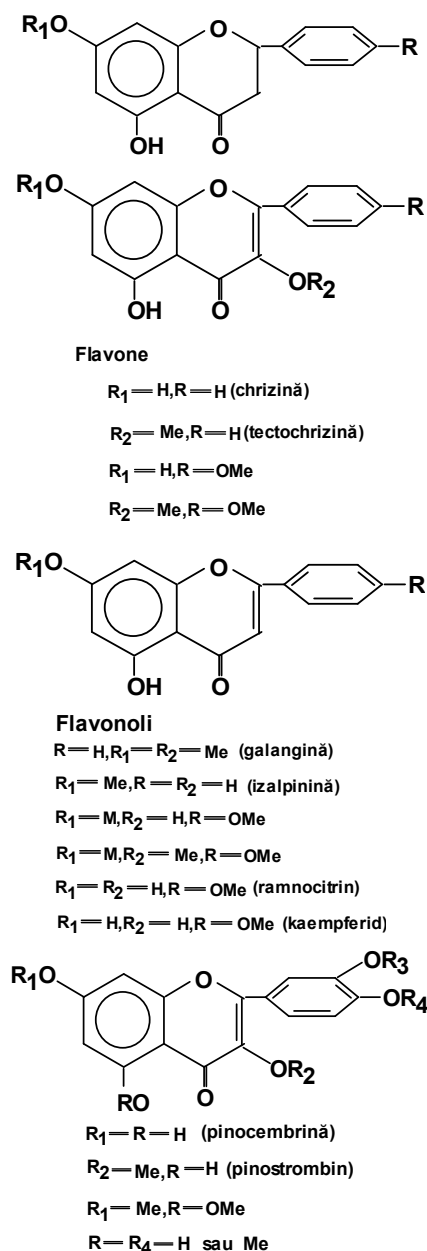


Figura 5. Principalele componente ale propolisului

3.3. Soluțiile extractive alcoolice

3.3.1. Tincturile

FR X. definește tincturile ca fiind: “preparate farmaceutice lichide extractive, sub formă de soluții alcoolice, hidroalcoolice sau eteroalcoolice, obținute prin extracția produselor vegetale sau animale”.

Denumirea vine din latinescul *tingere* = a colora, deoarece tincturile¹ sunt soluții colorate.

Raportul drog: solvent este de 1:10 (m/m) pentru tincturile preparate din produse vegetale care conțin substanțe puternic active (10%) și 1:5 (m/m) pt. tincturile preparate din alte produse vegetale (20%) [7].

Solventul folosit la extracție este în general alcoolul diluat (70%). Se mai folosesc amestecuri hidro-alcool-eterice, alte concentrații de alcool (50%), uneori acidulat (de regulă cu acid clorhidric) diluat, acid formic diluat 1%, acid fosforic 59%, în special pentru produsele vegetale care conțin alcaloizi.

Produsele vegetale care au conținut lipidic vor fi degresate în prealabil pentru a se obține un randament optim și preparate cu stabilitate corespunzătoare.

Umiditatea drogurilor uscate poate să fie cuprinsă între 2-20% (având în vedere că drogurile, deși uscate, conțin un procent de umiditate important).

Chiar dacă sunt preparate corect, tincturile ar putea să fie mai diluate din cauza apei conținute.

În această situație se recomandă folosirea unei cantități mai mari de drog sau folosirea unui alcool mai concentrat.

Metodele de preparare sunt:

- macerarea,
- macerarea repetată și
- percolarea.

Tincturile care au stabilitate redusă se prepară prin dizolvarea extractelor uscate sau prin diluarea extractelor fluide. Când se folosește o altă metodă de preparare, tincturile

¹ Nu pot fi considerate tincturi soluțiile alcoolice obținute prin dizolvarea unor substanțe chimice în alcool (ex. soluția iodoiodurată alcoolică, impropriu denumită, tinctură de iod).

obținute trebuie să corespundă condițiilor prevăzute în F.R.

Descriere: sunt lichide limpezi, colorate, cu mirosul și gustul caracteristice componentelor produsului vegetal și solventului folosit la preparare. Prin diluare cu apă, unele tincturi devin opalescente sau se tulbură. În F.R. se prevăd limite pentru:

- Fe^{3+} (0,001%) decelat sub forma complexului hexacianoferat (II) de potasiu (albastru), în comparație cu o soluție etalon;
- metale grele (0,001%) decelate ca sulfuri și comparate cu soluție etalon.
- conținut în alcool determinat conform prevederilor F.R. X la "Concentrația în alcool a preparatelor farmaceutice";
- reziduu prin evaporare: 10g tinctură se evaporă pe baia de apă, într-o fiolă de cântărire cu $d = 4\text{cm}$ și înălțimea de 2cm, în prealabil cântărită; se usucă la 105°C timp de 3 ore, se cântărește și se raportează la 100g tinctură;
- dozare: se face conform metodelor indicate la fiecare monografie, concentrația exprimându-se la 100g tinctură;

4. Materiale și metode

4.1. Descrierea produsului folosit

În studiu a fost folosit tinctură de propolis procurată din comerț (Fig.6).



Figura 6. Tinctura de propolis (Dacia Plant)

Ingrediente:

- Produse apicole: propolis (30%)

- Solvenți: alcool etilic 85% vol.
- Raport produs apicol/alcool etilic – 1:3
- Produsul nu conține conservanți și coloranți artificiali.

Produsul conține:

- flavone (acacetină, crizina, apigenina),
- flavonoli (galangina, izalpinină, kaempferol),
- flavanoide (pinocembrina, pinostrobină, pinobaksin),
- acizi fenolici (cafeic, cinamic),
- acid nicotinic,
- polifenoli,
- aldehide fenolice,
- sesquiterpene,
- coumarine,
- steroizi,
- fenilpropanoide,
- alcooli,
- cetone,
- glucide,
- uleiuri esențiale,
- balsamuri,
- vitamine (A, C, E, PP și componente ale complexului B),
- oligoelemente,
- aminoacizi,
- taninuri,
- polen, etc.

Tinctură de propolis reprezintă extractul alcoolic al propolisului, fiind obținută prin preparare la rece.

Dintre produsele vegetale și apicole administrate pe cale orală, soluțiile alcoolice și hidroalcoolice sunt cel mai ușor asimilate de către organism, efectul apărând la scurt timp.

În comparație cu metoda clasică de producție, Dacia Plant folosește un procedeu modern de percolare, care permite obținerea unui produs de calitate superioară.

4.2. Determinarea polifenolilor totali prin spectrometrie în UV-VIS

Spectrul UV-VIS a fost realizat pe Spectrofotometrul Shimadzu, UV-VIS, Pharma - SPEC 1700, iar absorbanta a fost măsurată

la 760 nm pe domeniul 190-1100 nm, viteza de scanare 240 nm/min, la pași de 1 nm (Fig. 7). Pentru a determina cantitatea totală de polifenoli au fost amestecate secvențial 20 μ l de tinctură de propolis (1 mg/ml) cu 300 μ l de apă distilată și 100 μ l reactiv Folin Ciocalteu.

După 4 minute, au fost adăugați 1000 μ l de apă distilată și 400 μ l de carbonat de sodiu 20%. Amestecul de reacție a fost păstrat la întuneric timp de 2 h la temperatura camerei iar absorbanta a fost măsurată la 760 nm.

Pentru curba de calibrare au fost folosite soluții standard de acid galic cuprinse între 0.5 și 20 μ g/ml ($y = 0,0082x$, $r^2 = 0.9980$, interceptare = 0.0018).



Figura 7. Spectrofotometrul Shimadzu, UV-VIS, Pharma-SPEC 1700

Cantitatea totală de polifenoli a fost exprimată ca echivalent acid galic (mg) per gram de extract (mg GAE/g extract uscat).

Toate analizele au fost efectuate folosind trei determinări din fiecare probă și calculând valoarea medie.

4.3. Determinarea conținutului total de flavonoide prin metoda colorimetrică

Conținutul total de flavonoide a fost determinat prin metoda colorimetrică bazată pe aluminiu și utilizând quercetina ca standard de referință.

Au fost folosiți 100 μ l de tinctură de propolis peste care s-au adăugat secvențial 1 ml de metanol, 3,5 ml de apă pentru HPLC, 2% (w/v) $AlCl_3$ (200 μ l) și 200 μ l acetat de potasiu.

După 30 minute de păstrare la temperatura camerei a fost măsurată

absorbanta la 435 nm cu ajutorul unui spectrofotometru.

Cantitatea totală de flavonoide a fost exprimată ca μ g echivalent quercetin per mg de substanță uscată.

4.4. Determinarea polifenolilor individuali prin LC-MS

Pentru a determina polifenolii individuali din tincture de propolis s-a utilizat cromatograful Shimadzu echipat cu detector I SPD-10A UV și LC-MS 2010, coloana EC 150/2 Nucleodur C18 Gravity SB 150 x 2mm x 5 μ m (Fig. 8).

Condițiile cromatografice au fost următoarele:

- faza mobilă A: apă acidulată cu acid formic la pH-3,
- B: acetonitril acidulat cu acid formic la pH-3,
- programul gradient: 0.01-20 min. 5% B, 20.01-50 min 5-40% B, 5-55 min, 40-95%B, 55-60 min 95%B.
- Debitul de solvent 0.2 ml/min,
- temperatura 20 °C.
- Lungimea de undă de monitorizare a fost de 280 nm și 320 nm.
- Curbele de calibrare au fost efectuate în intervalul 20-50 μ g/ml.



Figura 8. Cromatograful model Shimadzu

5. Rezultate și discuții

5.1. Determinarea polifenolilor totali prin spectrometrie în UV-VIS

Conținutul în polifenoli totali a tincturii de propolis a fost determinat prin metoda spectrofotometrică și este prezentată în tab. 2.

Tabelul 2.
Conținutul în polifenoli totali pentru tinctura de propolis

ID proba	mg GAE/g Repetare 1	mg GAE/g Repetare 1	mg GAE/g Repetare 1	Media
15	129,8	130,7	131,2	130,56

Media celor trei determinări efectuate a fost de 130,56 mg GAE/g.

5.2. Determinarea conținutului total de flavonoide prin metoda colorimetrică

Conținutul total de flavonoide exprimat în mg quercetin/g obținut în urma celor trei repetări este prezentat în *tab. 3*.

Tabelul 3.
Conținutul total de flavonoide pentru tinctura de propolis

ID proba	mg quercetin/g	mg quercetin/g	mg quercetin/g	Media
15	43,68	49,7	45,12	46,16

Media celor trei determinări pentru conținutul total de flavonoide a fost de 46,16 mg quercetin/g. Conținutul total de polifenoli și flavonoide poate varia din cauza unor factori diferiți, cum ar fi flora, perioada de colectare a rășinii, genetica reginei și perioada colectării (*fig. 9-10*).

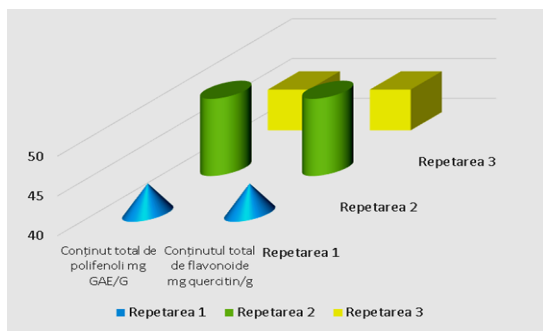


Figura 9. Valorile celor trei determinări pentru polifenoli totali și flavonoide

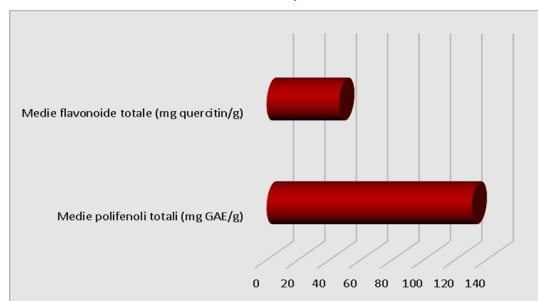


Figura 10. Media celor trei determinări pentru polifenoli totali și flavonoide

Această variabilitate ridicată în conținutul total de polifenoli și flavonoid apare datorită diferitelor surse de exudat vegetal, precum și de amplasarea stupinei [31].

Nu în ultimul rând, sezonul în care propolisul este colectat de albine este, de asemenea, un factor determinant pentru compoziția sa.

5.3. Identificarea polifenolilor individuali din tinctura de propolis prin LC-MS

În urma analizei prin lichid-cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă, în tinctura de propolis procurată din comerț am identificat următorii compuși prezentați în *Fig. 11* și *tab. 4*.

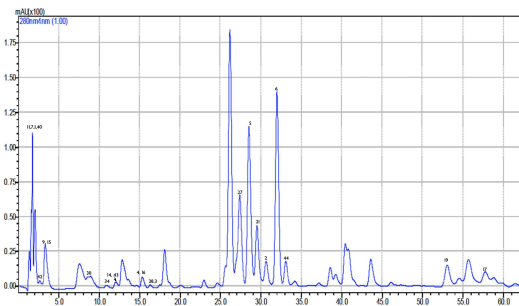


Figura 11. Cromatograma tincturii de propolis

Tabelul 4.
Compuși volatili identificați tinctura de propolis

Compus identificat	μg/g
Acacetin	14,6
Apigenin	83,5
Galagin	28,6
Kaempferol	8,21
Ac. cafeic	21,6
Pinocembrin	134,5
Pinobanksin	52,1
Rutin	39,2
Catechin	7,6
Ac. elagic	5,9
Ac. p-cumaric	34,2
Pinostrobin	18,2
Ac. Galic	32,7
Ac. izofeluric	4,6

În urma analizei gaz cromatografice în tinctura de propolis testată de noi au fost identificate 14 componente redate și în *Fig 12*.

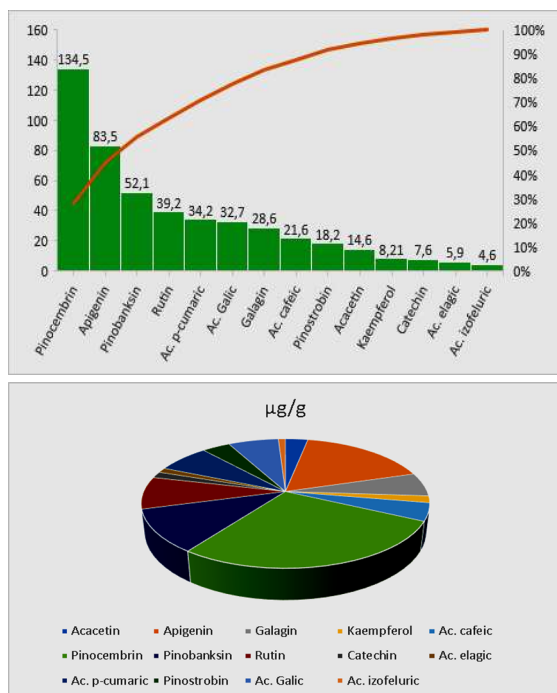


Figura 12. Reprezentarea principalilor compuși identificați în tinctura de propolis

O mare parte dintre aceste componente sunt redade de către producător și în fișa produsului. Pe lângă alți compuși, cei identificați de noi au fost identificați și de alți cercetători în propolis provenit din diferite regiuni ale Europei [16].

În urma analizei gaz cromatografice putem spune că, activitatea biologică a propolisului este atribuită compoziției sale chimice care cuprinde în principal compuși fenolici. Polifenolii din plante sunt cunoscuți pentru efectele benefice asupra sănătății. Există autori care au fost identificați peste 300 de constituenți în diferite probe de propolis și, care susțin că proporțiile depind de locul și ora recoltării [2,23].

Rezultatele obținute de noi sunt asemănătoare și cu ale altor cercetători care care au găsit, de asemenea, acid cumaric, acid ferulic și acid cafeic în propolisul Canadian (Nagar). Studii anterioare au descris, de asemenea, prezența acidului cafeic [19].

Cei mai importanți compuși activi sunt flavonoidele, terpenoidele și fenilpropanoizii, acizi aromatici și compuși fenolici [22, 29].

Afrouzan și col., [1] susțin că acidul cumaric este responsabil cu activitatea antimicrobiană a propolisului,

Acacetina este un aglicon care poate fi derivat de la hidroliza glicozidului flavonoid respectiv din frunzele unor plante, cum ar fi *Pseudacacia robinia* [17].

Wagh [33] susține că, modul de acțiune al propolisului se datorează interacțiunii dintre compuși fenolici și alți compuși, cum ar fi pinocembrin, galagin și pinobanksin.

Componente ale propolisului, cum ar fi pinocembrin, prezintă activitate antibacteriană față de *Streptococcus spp.*, iar acid p-cumaric asupra lui *Helicobacter pylori*.

Acidul cafeic, diterpenoizii și compușii fenolici prezintă capacitate distructivă împotriva celulelor tumorale. Efectul antitumoral al propolisului se datorează funcției combinate a constituenților polifenolici [29]. Studii anterioare au raportat că, constituenți ai propolisului cum ar fi, 3-acetilpinobanksin, pinobanksin-3-acetat, pinocembrin, acid p-cumaric și acid cafeic prezintă activitate anti-fungică [3, 9].

Se pare că, datorită compoziției complexe propolisul posedă o gamă largă de acțiuni farmacologice, inclusiv antibacteriene, antifungice, antiprotozoarice, hepatoprotectoare, antioxidante, antiinflamatoare, antivirale și antitumorale.

6. Concluzii

În urma studiului privind compoziția chimică a extractului de propolis, putem concluziona că:

- au fost determinate cantități crescute de polifenoli totali și flavonoide;
- prin lichid cromatografie cuplată cu spectrometria de masă au fost identificați 14 compuși, cele mai mari cantități fiind înregistrate pentru pinocembrin, apigenin și pinobanksin;
- conținutul total de polifenoli și flavonoide poate varia din cauza unor factori diferiți, cum ar fi flora, perioada de colectare a rășinii, genetica reginei și perioada colectării;

- toate activitățile farmacologice ale propolisului se datorează compoziției chimice complexe.

Bibliografie

1. Afrouzan, H., Zakeri, S., Mehrizi, A.A., Molasalehi, S., Tahghighi, A., Shokrgozar, M.A., Es hagh, A., Djadid, N.D., 2017, Anti-Plasmodial Assessment of Four Different Iranian Propolis Extracts. Archives of Iranian Medicine (AIM) 20.
2. Ahmed, R., Tanvir, E., Hossen, M.S., Afroz, R., Ahmmed, I., Rumpa, N.-E., Paul, S., Gan, Alencar, S.M., Oldoni, T.L., Castro, M.L., Cabral, I.S., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen P.L., Ikegaki M., 2007, Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. J. Ethnopharmacol. 113(2):278- 283.
3. Aminimoghadamfarouj, N., Nematollahi, A., 2017, Propolis Diterpenes as a Remarkable Bio-Source for Drug Discovery Development: A Review. Int. J. Mol. Sci. 18 (6).
4. Becerra, T.B., Calla-Poma, R.D., Requena-Mendizabal, M.F., Millones-Gomez, P.A., 2019, Antibacterial effect of Peruvian propolis collected during different seasons on the growth of streptococcus mutans. Open Dent. J. 13 (1).
5. Bura, M., 1996, Creșterea intensivă a albinelor, Ed. Helicon Timișoara.
6. Cristina, R. T., Dana-Nicoleta Duță, Țuhașu, C., 2001, Activitatea 'in vitro' a unor extracte hidro-alcoolice de propolis. Lucr. Șt. Med.Vet. Timișoara, Vol XXXIV, 111-122.
7. Cristina, R.T. Eugenia Dumitrescu, Darău, A., 2007, Propolis' activity on some blood parameters in rats. Lucr. Șt. Med. Vet, vol. XL, 2007, Timișoara, p. 344 – 356.
8. Crișan, I., Muțiu, A., Sanhnazarov, N., Cioca, V., Eșanu, V., Popescu, A., 1990, Acțiunea propolisului asupra virusului herpetic "in vitro". Propolis, Ed, Apimondia, București, 120-125.
9. Devequi-Nunes, D., Machado, B.A.S., Barreto, G.A., Rebouças Silva, J., da Silva, D.F., Drescher, N., Klein, A.M., Schmitt, T., Leonhardt, S.D., 2019, A clue on bee glue: New insight into the sources and factors driving resin intake in honeybees (*Apis mellifera*). PLoS ONE 14 (2).
10. Elkhenany, H., El-Badri N., Dhar M., 2019, "Green propolis extract promotes in vitro proliferation, differentiation, and migration of bone marrow stromal cells." Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie 115.
11. Elnakady, Y.A., Rushdi, A.I., Franke, R., Abutaha, N., Ebaid, H., Baabbad, M., Omar, M.O., Al Ghamdi, A.A., 2017, Characteristics, chemical compositions and biological activities of propolis from Al-Bahah, Saudi Arabia. Sci. Rep. 7.
12. Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A., Cunha, A., Aguiar, C., 2010, How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microbial. Biotechnol. 1, 481–493.
13. Gajdács, M., 2019, The Continuing Threat of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antibiotics (Basel, Switzerland) 8 (2).
14. Galeotti, F., Maccari, F., Fachini, A., Volpi, N., 2018, Chemical Composition and Antioxidant Activity of Propolis Prepared in Different Forms and in Different Solvents Useful for Finished Products. Foods (Basel, Switzerland) 7 (3).
15. Guzman, J.D., 2014, Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. Molecules (Basel, Switzerland) 19 (12).
16. Kasiotis, K.M., Anastasiadou, P., Papadopoulos, A., Machera K., 2017, Revisiting Greek Propolis: Chromatographic Analysis and Antioxidant Activity Study, Plos ONE,
17. Król, W., Bankova, V., Sforcin, J.M., Szliszka, E., Czuba, Z., Kuropatnicki, A.K., 2013, Propolis: properties, application, and its potential. Evidence-Based Complement. Alternat. Med.
18. Kuropatnicki, A.K., Szliszka, E., Krol, W., 2013, Historical aspects of propolis research in modern times. Evidence-Based Complement. Alternat. Med.
19. Niculae, M., Stan, L., Pall, E., Paștiu, A.I., Balaci, J.M., Muste S., Spînu M., 2015, In vitro synergistic antimicrobial activity of

- romanian propolis and antibiotics against *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanaci* 43(2):327-334.
20. **Oryan, A., Alemzadeh E., Moshiri, A., 2018**, "Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities." *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 98.
 21. **Park, Y.K., Alencar, S.M., Aguiar, C.L., 2002**, Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.* 50(9):2502-2506.
 22. **Pasupuleti, V.R., Sammugam, L., Ramesh, N., Gan, S.H., 2017**, Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017.
 23. **Pietta, P.G., Gardana, C., Pietta, A.M., 2002**, Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia* 73(Suppl.1):S7-S20.
 24. **Popravko, S. A., 1990**, Compoziția chimică a propolisului, originea lui și problemele standardizării. *Propolis*, Ed. Apimondia, București, 58-62.
 25. **Przybyłek, I., Karpin´ Ski, T.M., 2019**, Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules (Basel, Switzerland)* 24 (11).
 26. **Rocha, J.L.C., Brandão, H.N., Borges, V.M., Umsza-Guez, M.A., 2018**, Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLoS ONE* 13 (12).
 27. **Salomao, K., Pereira, P.R.S., Campos, L.C., Borba, C.M., Cabello, P.H., Marcucci, M.C., De Castro, S.L., 2008**, Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evidence-Based Complement. Alternat. Med.* 5, 317–324.
 28. **Sawicka, D., Car, H., Borawska, M.H., Niklin´ Ski, J., 2012**, The anticancer activity of propolis. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 50, 25–37.
 29. **Sforcin, J.M., 2016**, Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytother. Res.* 30 (6), 894–905.
 30. **Sulaiman, S.H., Khalil, S.A., 2017**, Antioxidant properties and cardioprotective mechanism of Malaysian propolis in rats. *Evidence-Based Complement. Alternat. Med.*
 31. **Toreti, V.C., Sato, H.H., Pastore, G.M., Park, Y.K., 2013**, "Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM 2013.
 32. **Velescu, G., Marin, M., 1990**, Propolisul – probleme de farmacochimie și farmacodinamie. *Propolis*, Ed. Apimondia, București, 108-111.
 33. **Wagh, V.D., 2013**, Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Adv. Pharmacol. Sci.*, 5, 112-117.
 34. **Watanabe, M.A.E., Amarante, M.K., Conti, B.J., Sforcin, J.M., 2011**, Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J. Pharm. Pharmacol.* 63, 1378–1386.
 35. **Won Seo, K., Park, M., Jung Song, Y., Kim, S.J., Ro Yoon, K., 2003**, The protective effects of propolis on hepatic injury and its mechanism. *Phytother. Res.* 17, 250–253.
 36. **Wozniak, M. M., L.; Waskiexicz; A.; Rogozinski, T.; Ratajczak; I.; 2019**, The role of seasonality on the chemical composition, antioxidant activity and cytotoxicity of Polish propolis in human erythrocytes. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 29(3).
 37. **Yilmaz, S., Sova, M., Ergün, S., 2018**, Antimicrobial activity of trans-cinnamic acid and commonly used antibiotics against important fish pathogens and nonpathogenic isolates. *J. Appl. Microbiol.*