

Ispitivanje antioksidantne aktivnosti i biodostupnosti *in vitro* digestovanog propolisa

U ovom radu su ispitivane bioaktivnosti čvrstog propolisa i njegovog etanolnog ekstrakta (EEP) u uslovima simulirane digestije. In vitro digestija simulirana je u tri faze, oralnoj, gastričnoj i duodenalnoj. Ispitana je antioksidantna aktivnost digestovanih uzoraka oba tipa, a zatim je upoređena sa antioksidantnom aktivnošću nedigestovanih uzoraka. Za određivanje antioksidantne aktivnosti korišćen je ABTS esej. Pokazalo se da su digestovani uzorci jači inhibitori oksidacije ABTS katjona od nedigestovanih. Najveću inhibiciju oksidacije izazvao je digestovani EEP, dok je stepen inhibicije čvrstim nedigestovanim propolisom bio nedetektabilan. Veća antioksidantna aktivnost digestovanih uzoraka se pripisuje povećanju koncentracije polifenola i flavonida (jedinjenja od kojih potiče antioksidantna aktivnost) tokom digestije. Da bi se odredio procenat polifenola iz uzoraka propolisa koji biva resorbovan, te samim tim i iskorišćen u organizmu, merena je biodostupnost. Resorpcija polifenola iz digestivnog trakta simulirana je na principu dijalize. Nakon dijalize došlo je do promene koncentracije polifenola. Rezultati ukazuju da se biodostupnost povećava tokom digestije, te da je veća biodostupnost polifenola iz EEP-a nego iz čvrstog propolisa. Utvrđene su bioaktivnosti in vitro digestovanih uzoraka propolisa, ali se bez daljih istraživanja ne bi moglo reći da li bi se isti rezultati dobili i nakon ispitivanja u in vivo model sistemima.

Uvod

Propolis je lepljiva, mrka supstanca koju pčele skupljaju iz biljaka i mešaju sa voskom. Pčele ga koriste za popunjavanje šupljina u košnici. U narodnoj medicini poznat je kao lek koji ima antibiotska dejstva. Potvrđena je njegova antioksidantna aktivnost, a smatra se i da usporava rast ćelija tumora (Burdock 1998).

Hemijski sastav ove supstance zavisi od fitogeografije, jer pčele sa različitih područja koriste različite vrste biljaka kao izvor propolisa (Popova *et al.* 2010). Ova činjenica sprečava njegovu standardizaciju, i zbog

Vanja Radišić (1995), Arilje, Dragojla Stojića 2, učenica 1. razreda SŠ „Sveti Ahilije” u Arilju

*MENTOR:
Goran Tomić,
diplomirani biohemičar*

toga različiti rastvarači (etanol, metanol ili voda) mogu ekstrahovati različite komponente propolisa, pri tome utičući na njegovu aktivnost (Cunha *et al.* 2004). Najčešće, u sastav propolisa ulaze smola (50%), vosak (30%), polen (5%), esencijalna ulja (10%) i bioaktivna jedinjenja (Burdock 1998). Bioaktivna jedinjenja pronađena u propolisu su flavonoidi (najčešće naringenin), alifatične kiseline (heksadekanska i 9-oktadekanska), aromatična jedinjenja (benzojeva kiselina, ferulna kiselina, 2-pentenska kiselina, 4-pentenska kiselina), estri i alkoholi.

Glavne komponente propolisa su estri masnih kiselina, fenoli i cimetna kiselina (Greenaway *et al.* 1998; Kujumgiev *et al.* 1999). Upravo ove komponente imaju antibiotsko dejstvo (Greenaway *et al.* 1998; Kujumgiev *et al.* 1999). Poznato je da antioksidantna aktivnost propolisa potiče od polifenola i flavonoida koji se u njemu nalaze (Kalogeropoulos *et al.* 2009). Utvrđeno je da flavonoidi čine od 4.8 do 37.2% ukupne mase propolisa, dok fenolne kiseline i njihovi estri čine od 3.21 do 17.1% (Kalogeropoulos *et al.* 2009). Zbog ovakvog hemijskog sastava, propolis se pokazao kao dobar antioksidant kako u *in vivo*, tako i u *in vitro* istraživanjima (Kalogeropoulos *et al.* 2009).

Većina istraživanja se odnosi na bioaktivnost čvrstog propolisa u obliku u kome se on nalazi u prirodi ili njegovih ekstrakata. Kao supstanca koja se uzima oralno, propolis u organizmu podleže digestiji. Cilj ovog rada je ispitivanje promena u bioaktivnostima propolisa nakon digestije. Ispitivana je njegova antioksidantna aktivnost nakon digestije, a zatim i njegova biodostupnost. Upoređivana je antioksidantna aktivnost *in vitro* digestovanog etanolnog ekstrakta propolisa i čvrstog propolisa sa antioksidantnom aktivnošću nedigestovanih uzoraka oba tipa, kao i biodostupnost fenola iz oba tipa uzoraka nakon simulirane gastrične i duodenalne faze digestije.

Materijal i metode

Simulacija digestije tekla je u tri faze. Najpre je simulirana oralna faza digestije (varenje u ustima), zatim gastrična (varenje u želucu), a na kraju duodenalna (varenje u crevima). Na ovaj način su digestovana oba tipa uzoraka. Zatim su pripremljene nedigestovane kontrole EEP-a i čvrstog propolisa. Nakon simulacije digestije i pripremanja kontrola, izmerena je koncentracija bioaktivnih jedinjenja (polifenola i flavonoida) u digestovanim i nedigestovanim uzorcima. Zatim je određena njihova antioksidantna aktivnost. Za određivanje antioksidantne aktivnosti primenjen je ABTS esej. Drugi deo ovog rada bilo je ispitivanje biodostupnosti oba tipa uzoraka nakon gastrične i duodenalne faze digestije. Biodostupnost je određivana na osnovu sadržaja polifenola u uzorcima nakon dijalize.

Korišćen je propolis prikupljen na Zlatiboru 2009. godine. Etanolni ekstrakt propolisa pripremljen je po proceduri opisanoj u Matsushige *et al.* (1996). Smeša koja sadrži 10 g propolisa i 125 mL 70% etanola zagrevana je i mešana na magnetnoj mešalici (200 rpm) na temperaturi od 70°C 30 minuta. Ekstrakt je centrifugiran 20 minuta na 3000 rpm. Talog je od supernatanta odvojen filtriranjem. Supernatant je držan 4 h na temperaturi od 4°C, a zatim ponovo profiltriran, kako u njemu ne bi bilo voska.

Digestija *in vitro*

Digestija *in vitro* je simulirana po protokolu opisanom u Gil-Izquierdo *et al.* iz 2002. Simulirana je digestija etanolnog ekstrakta (EEP), a zatim i čvrstog propolisa. Oba uzorka tretirana su na isti način. Pri simulaciji oralne faze digestije uzorcima (1.67 mL EEP, 0.13 g čvrstog propolisa) je dodavan PBS (pH 6.9, 0.04% NaCl i 0.004% CaCl₂) do ukupne zapremine od 17 mL. Smeša je inkubirana 30 minuta na 37 °C. Kako propolis provodi zanemarljiv vremenski period u ustima, oralna faza digestije se ne odigrava u potpunosti, pa zbog toga amilaza nije korišćena u ovom eksperimentu. Kako bi se simulirala гастриčna faza digestije, nakon inkubacije smeše, njena pH dovedena je do 2 titracijom HCl-om. Smeši je dodato 1.67 mg pepsina ratvorenog u 1 mL 0.01 M HCl. Nova smeša je inkubirana 2 h na 37°C na 200 rpm. Poslednji korak simulirane digestije bila je duodenalna faza. Ova faza simulirana je tako što je pH digestivne smeše dovena do 6.9 titracijom NaHCO₃, a zatim joj je dodat rastvor 13.3 mg Digestal forte® (tripsin, lipaza, amilaza i žučne soli) u 1 mL PBS-a. Duodenalna smeša inkubirana je na magnetnoj mešalici 2 h na 37°C. Nakon poslednje inkubacije, smeša je centrifugirana 20 minuta na 3000 rpm. Supernatant je od taloga odvojen dekantovanjem. Supernatant je čuvan na 4°C.

Nakon digestije određena je koncentracija fenola i flavonoida u uzorcima kao i u nedigestovanim kontrolama. Nedigestovana kontrola za etanolni ekstrakt pripremljena je tako što je u 1.67 mL etanolnog ekstrakta dodat PBS do ukupne zapremine od 17 mL. Smeša je držana na sobnoj temperaturi 4.5 h (u trajanju *in vitro* digestije), a zatim centrifugirana na 3000 rpm 20 minuta. Nedigestovana kontrola čvrstog propolisa je napravljena na isti način, samo je kao polazna supstanca korišćeno 0.13 g čvrstog propolisa.

Određivanje koncentracije polifenola

Koncentracija fenola merena je po protokolu opisanom u radu Dewanto *et al.* iz 2002. U 125 µL uzorka dodato je 0.5 mL destilovane vode i 125 µL FC (Folin-Ciocalteu) reagensa. Nakon 6 minuta dodato je 1.25 mL prethodno pripremljenog 7% rastvora Na₂CO₃, a zatim je dodata

destilovana voda do ukupne zapremine od 3 mL. Nakon inkubacije od 90 minuta, merena je apsorbanca na 760 nm (CECIL 2021, model 2000, Cambridge, UK). Standardna kriva napravljena je merenjem apsorbanca rastvora galne kiseline koncentracija od 0.5 do 10 $\mu\text{g/mL}$. Uzorci su pre dodavanja u reakcionu smešu duplo razblaženi.

Određivanje koncentracije flavonoida

Za određivanje koncentracije flavonoida pripremljeni su 5% rastvor NaNO_2 , 10% rastvor $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ i 1 M rastvor NaOH . U 250 μL uzorka dodato je 1.25 mL destilovane vode i 75 μL 5% rastvora NaNO_2 . Nakon 6 minuta dodato je 150 μL 10% $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, zatim nakon 5 minuta i 0.5 mL 1 M rastvora NaOH . Na kraju je dodata destilovana voda do ukupne zapremine od 2.5 mL. Nakon pripremanja uzoraka, apsorbanca ovih rastvora merena je na 510 nm. Koncentracija flavonoida u digestovanom propolisu i kontrola određivana je na osnovu standardne krive napravljene pomoću koncentracija od 5 do 100 $\mu\text{g/mL}$ kvercetina (Dewanto *et al.* 2002).

Ispitivanje antioksidantne aktivnosti – ABTS esej

Za utvrđivanje antioksidantne aktivnosti, primenjen je ABTS (3-etil-benzotiazolin-6-sulfonska kiselina) esej. Ovim esejem je meren stepen inhibicije oksidacije ABTS katjona. Pomešani su 1 mL 7 mM rastvora ABTS-a i 40 μL 60 mM rastvora kalijum-persulfata. ABTS katjon je dobijen kao proizvod reakcije ABTS-a i kalijum persulfata. Smeša je tokom noći ostavljena u mraku. Nakon toga, smeša je rastvorena u destilovanoj vodi tako da na talasnoj dužini od 670 nm apsorbanca bude 0.7. Zatim je u 40 μL svakog od uzoraka dodato 2 mL razblaženog rastvora ABTS-a (pipetiranje je izvršeno direktno u kivetu). Apsorbanca je očitavana na 670 nm. Manja apsorbanca označava veći stepen inhibicije oksidacije (Salah *et al.* 1995; Rice-Evans i Miller 1996).

Dijaliza i određivanje biodostupnosti

Biodostupnost (procenat supstance resorbovan u digestivnom traktu tokom digestije) propolisa je određivana *in vitro* nakon gastrične i duodenalne faze digestije. Nakon gastrične faze *in vitro* digestije, uzet je alikvot digestivne smeše i dijalizovan. Isto je urađeno i sa alikvotom duodenalne smeše. Dijaliza je vršena naspram 200 mL fosfatnog pufera (pH 7.4; 20 mM). Zasebno su dijalizovani alikvoti iz gastrične i duodenalne faze. Sistemi za dijalizu su ostavljeni na magnetnoj mešalici 2 h na 200 rpm i 37°C. Za dijalizu je korišćeno celulozno crevo (Sigma-Aldrich, cut off 12 kDa). Ovaj postupak je primenjen na oba tipa uzorka – čvrstom propolisu i etanolnom ekstraktu propolisa.

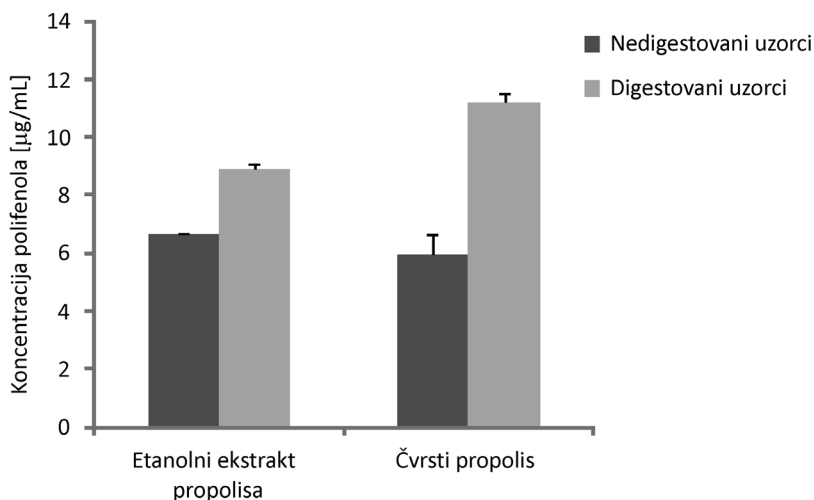
Koncentracija fenola u dijalizovanim uzorcima upoređena je sa koncentracijom fenola u nedijalizovanim uzorcima. Biodostupnost (u procentima) određena je na osnovu formule

$$BA = 100\% - \frac{PCs}{PCDF} \times 100\%,$$

gde je PCs koncentracija fenola u dijalizovanim, a PCDF u nedijalizovanim uzorcima (Gil-Izquierdo *et al.* 2002). Koncentracija fenola je određivana po već opisanom postupku.

Rezultati i diskusija

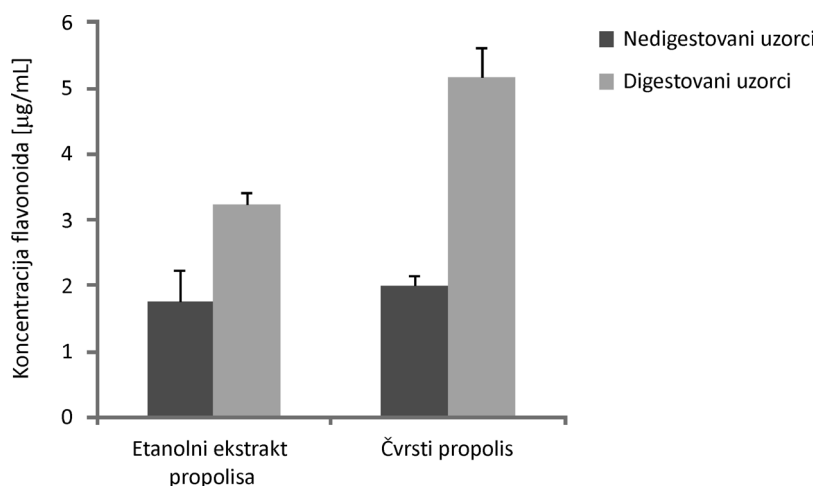
Koncentracija polifenola. Rezultati pokazuju da se koncentracija polifenola u čvrstom propolisu i etanolnom ekstraktu pre i nakon digestije razlikuju. U uslovima simulirane digestije povećava se količina polifenola u rastvoru (slika 1). Koncentracija polifenola u nedigestovanom etanolnom ekstraktu propolisa iznosila je $6.65 \pm 0.13 \mu\text{g/mL}$, dok je nakon digestije iznosila $8.92 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$. U uzorku čvrstog propolisa koncentracija polifenola pre digestije bila je $5.98 \pm 0.368 \mu\text{g/mL}$, a nakon digestije iznosila je $11.18 \pm 0.34 \mu\text{g/mL}$. Primećeno je da je *in vitro* digestija podstakla oslobađanje polifenola.



Slika 1.
Koncentracija polifenola u etanolnom ekstraktu (EEP) i čvrstom propolisu pre i nakon simulacije digestije

Figure 1.
Concentration of polyphenolic compounds in ethanolic extract of propolis and solid substance before and after simulation of digestion

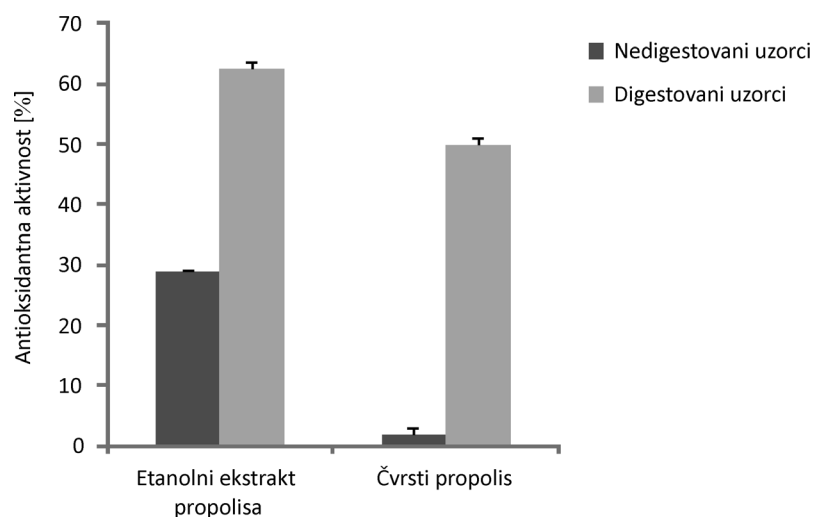
Koncentracija flavonoida se nakon *in vitro* digestije u etanolnom ekstraktu od $1.8 \pm 0.5 \mu\text{g/mL}$ povećala do $3.22 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$. U čvrstom propolisu, koncentracija flavonoida pre digestije bila je $2.00 \pm 0.16 \mu\text{g/mL}$, dok se nakon digestije povećala do $5.16 \pm 0.16 \mu\text{g/mL}$. Dobijeni rezultati pokazuju da se u uslovima simulirane digestije, osim koncentracije polifenola, povećava i koncentracija flavonoida (slika 2).



Slika 2.
Koncentracija flavonoida u etanolnom ekstraktu propolisa (EEP) i čvrstom propolisu pre i nakon simulacije digestije

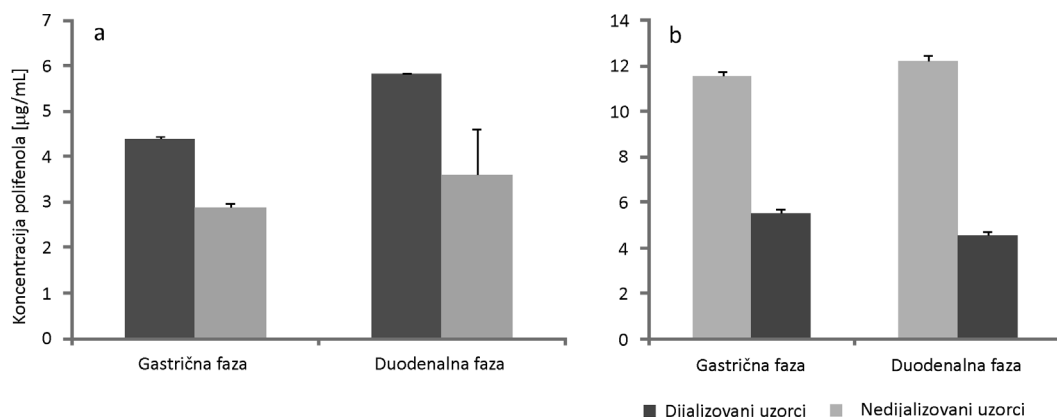
Figure 2.
Concentration of flavonoids in *in vitro* digested and non-digested ethanolic extract of propolis (EEP) and solid propolis

Antioksidantna aktivnost. Nedigestovani etanolni ekstrakt propolisa pokazao je stepen inhibicije od $29.00 \pm 0.14\%$. Pokazalo se da je stepen inhibicije oksidacije pri korišćenju digestovanog etanolnog ekstrakta kao antioksidanta $62 \pm 1\%$. Pri korišćenju čvrstog propolisa kao antioksidanta stepen inhibicije oksidacije ABTS katjona je nedetektabilan. Antioksidantna aktivnost čvrstog propolisa se nakon digestije povećala, pa je procenat inhibicije iznosio $50 \pm 1\%$. Dobijeni rezultati ukazuju da se tokom digestije antioksidantna aktivnost uzoraka povećava (slika 3). Povećanje antioksidantne aktivnosti nakon digestije, pripisuje se povećanju koncentracije flavonoida i polifenolnih komponenti od kojih potiče antioksidantna aktivnost.



Slika 3.
Procenat inhibicije oksidacije ABTS-a digestovanim i nedigestovanim etanolnim ekstraktom i čvrstim propolisom

Figure 3.
Oxidation of ABTS cation caused by digested and non-digested ethanolic extract of propolis (EEP) and solid propolis

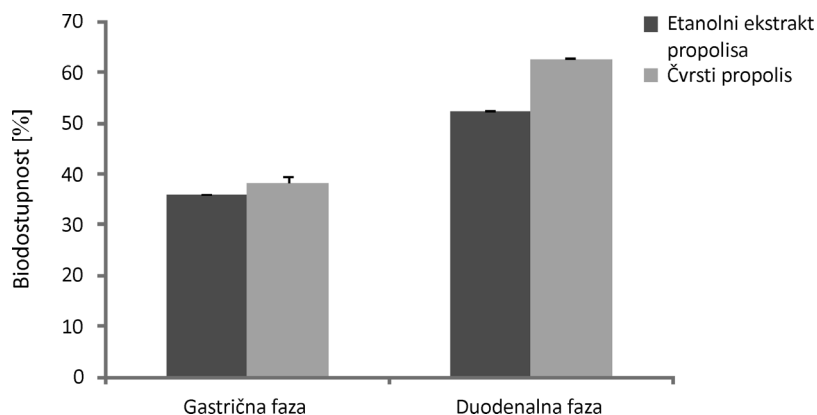


Slika 4. Koncentracija polifenola pre i nakon dijalize u etanolnom ekstraktu propolisa (EEP) (a) i čvrstom propolisu (b) tokom gastrične i duodenalne faze digestije

Figure 4. Concentration of polyphenols in ethanolic extract of propolis (EEP) (a) and solid propolis (b) before and after dialysis during simulation of gastric and duodenal phase of digestion

Biodostupnost. Koncentracija polifenola u dijalizovanoj smeši smanjena nakon dijalize (slike 4 i 5). Ova promena koncentracije polifenola potvrdila je da određena količina polifenola iz propolisa biva resorbovana, te se može govoriti o biodostupnosti njegovih komponenti. Manja koncentracija polifenola u crevu za dijalizu se pripisuje prolasku polifenola manje molekulske mase kroz membranu creva.

Na slici 5 prikazan je procenat polifenola resorbovanih tokom dijalize iz etanolnog ekstrakta i iz čvrstog propolisa. Procenat resorbovanih polifenola predstavlja biodostupnost. Biodostupnost etanolnog ekstrakta propolisa tokom gastrične faze digestije je $35.76 \pm 0.08\%$, dok se tokom duodenalne faze biodostupnost povećala i iznosi $38.21 \pm 0.16\%$. Biodostupnost čvrstog propolisa je veća u odnosu na biodostupnost etanolnog ekstrakta – tokom gastrične faze biodostupnost iznosi $52.2 \pm 0.6\%$, a tokom duodenalne $63 \pm 1\%$. Utvrđeno je da se biodostupnost polifenola povećava tokom digestije. Veća biodostupnost se pripisuje promeni pH iz kisele u baznu. Sa povećanjem pH, povećava se i solubilnost polifenola. Rastvarači čija pH je blizu neutralne ili je slabo bazna (oko 8) mogu ekstrahovati i 70% ukupnog sadržaja polifenola (Sondheimer 1971). U gastričnoj fazi simulirane digestije pH je izrazito kisela, dok je u duodenalnoj fazi blizu neutralne. Zbog toga su polifenoli solubilniji u duodenalnoj nego u gastričnoj fazi digestije. Takođe, do manje biodostupnosti može dovesti i adsorpcija polifenola na proteine dodate tokom simulacije digestije čija je



Slika 5. Biodostupnost *in vitro* digestovanog etanolnog ekstrakta propolisa (EEP) i čvrstog propolisa tokom gastrične i duodenalne faze digestije

Figure 5. Bioaccessibility of *in vitro* digested ethanolic extract of propolis and solid propolis during gastric and duodenal phase of digestion

molekulska masa veća od 12 kDa. Biodostupnost polifenola iz propolisa merena je kao jedna od važnih osobina ove supstance, jer iako se prilikom digestije oslobodi znatna količina polifenola, svoje fiziološke efekte polifenoli u *in vivo* sistema ostvaruju tek nakon resorpcije.

Zaključak

Model digestije *in vitro* zajedno sa dijalizom pokazao se kao dobar metod za ispitivanje biodostupnosti polifenola iz propolisa. Nakon ispitivanja, utvrđeno je da se koncentracija polifenola i flavonoida tokom digestije povećava, kao i da se veći procenat polifenola apsorbuje iz čvrstog propolisa nego iz etanolnog ekstrakta.

Kao bolji antioksidanti su se pokazali digestovani uzorci. Veća antioksidantna aktivnost se u ovom slučaju pripisuje većoj koncentraciji polifenola i flavonoida u digestovanim uzorcima. Najveći procenat inhibicije oksidacije ABTS-a uočen je pri korišćenju digestovanog etanolnog ekstrakta kao antioksidanta. Pretpostavljamo da se veća antioksidantna aktivnost etanolnog ekstrakta može pripisati različitom sastavu polifenola. Na osnovu ranijih istraživanja poznato je koji polifenoli preovladavaju u propolisu, ali da bi se pouzdano znalo zašto dolazi do povećanja antioksidantne aktivnosti, neophodno je detaljnije ispitati koji polifenoli se oslobađaju simulacijom digestije. Biodostupnost i antioksidantna aktivnost digestovanog propolisa ispitivane su *in vitro*. Bilo bi zanimljivo proveriti postoji li razlika između rezultata dobijenih u ispitivanjima sprovedenim u *in vitro* sistemima i onih dobijenih *in vivo* istraživanjima.

Literatura

- Burdock G. A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of the bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, **36**: 347.
- Cunha I. B. S., Sawaya A.C.H.F., Caetano F. M., Shimizu M. T., Marcucci M.C., Drezza F.T. Povia G.S., Carvalho P.O. 2004. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **15**: 964.
- Dewanto V., Wu X., Adom K. K., Liu R. H. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **50**: 3010.
- Gil-Izquierdo A., Zafrilla P., Tomas Barberan F. A. 2002. An in vitro method to simulate phenolic compound release from the foodmatrix in the gastrointestinal tract. *European Food Research and Technology*, **214**: 155.
- Greenaway W., Scaysbrook T., Whatley F. R. 1988. Composition of propolis of Oxfordshire, UK, and its relation to poplar bud exudate. *Zeitschrift fur Naturforschung*, **43**: 301.
- Kalogeropoulos N., Konteles S. J., Troullidou E., Mourtzinis I., Karathanos V. T. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, **116**: 452.
- Kujumgiev A., Bankova V., Ignatova A., Popov S. 1993. Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. *Pharmazie*, **48**: 785.
- Kujumgiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R., Popov S. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, **64**: 235.
- Matsushige K., Basnet P., Hase K., Kadota S., Tanaka K., Namba T. 1996. Propolis protects pancreatic β -cells against the toxicity of streptozotocin (STZ). *Phytomedicine*, **3** (2): 203.
- Mirzoeva O. K., Grishanin R. N., Calder P. C. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*, **152**: 239.
- Popova M., Chen C. N., Chen P. Y., Huang C. Y., Bankova V. 2010. A validated spectrophotometric method for quantification of prenylated flavanones in Pacific propolis from Taiwan. *Phytochemical Analysis*, **21**: 186.
- Reboul E., Richelle M., Perrot E., Desmoulins-Malezet C., Pirisi V., Borel P. 2006. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **54**: 1906.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J. 1995. Antioxidants—the case for fruit and vegetables in the diet. *British Food Journal*, **97**: 35.
- Salah N., Miller N. J., Paganga G., Tijburg L., Rice-Evans C. A. 1995. Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch. Biochem. Biophys.*, **322**: 339.
- Singleton V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **299**: 152.

Antioxidant Activity and Bioavailability of *In vitro* Digested Propolis

Propolis is a resinous substance collected by *Apis mellifera* from various tree buds. Because of its antimicrobial activity, propolis is used as a folk medicine. Propolis is also known by its antioxidant and antifungal activity. More than 300 constituents have been identified in different propolis samples. Flavonoids, aromatic acids, diterpenic acids and phenolic compounds appear to be principal components responsible for the biological activities of this substance. Because of its chemical composition propolis has proved itself as a good antioxidant in *in vivo* and *in vitro* researches. All the research is based on biological activities of propolis in the shape in which it appears in nature. However, in living organisms, propolis components are absorbed by cells after digestion. In this work antioxidant activity of *in vitro* digested propolis was investigated. The bioavailability of *in vitro* digested propolis was also measured.

The first step in this experiment was to simulate digestion. The digestion of solid propolis and ethanolic extract of propolis (EEP) was simulated in three phases – oral, gastric and duodenal. After simulation of digestion, the concentration of polyphenols and flavonoids in digested samples and non-digested controls were measured. The results showed that during digestion concentration of polyphenols in EEP increased from 6.65 ± 0.13 to $8.92 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$, and in solid propolis concentration increased from 6.0 ± 0.4 to $11.2 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$. The concentrations of flavonoids also changed during digestion. In ethanolic extract concentration increased from 1.8 ± 0.5 to $3.22 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$ and in solid propolis concentration increased from 2.00 ± 0.16 to $5.16 \pm 0.16 \mu\text{g/mL}$. It was noticed that simulated digestion has an effect on the increase of concentration of biological active components of propolis. After measuring concentrations of biologically active compounds, antioxidant activity of *in vitro* digested samples was determined and compared to antioxidant activity of non-digested samples. For determination of antioxidant activity, ABTS essay was used. In this essay the inhibition of oxidation of ABTS cation caused by *in vitro* digested EEP and solid propolis was followed. The level of inhibition caused by digested samples was compared to the level of inhibition caused by non-digested controls. The level of inhibition caused by non-digested EEP was $29.00 \pm 0.14\%$, but after digestion it increased to $62.43 \pm 1.14\%$. Antioxidant activity of non-digested solid propolis was not detectable. However, after digestion level of inhibition was $50 \pm 1\%$. The results indicate that in conditions of simulated digestion antioxidant activ-

ity increases. It is assumed that the higher level of antioxidant activity after digestion is caused by increase of concentration of polyphenols, compounds which carry antioxidant activity of substance. However, for further investigation of causes of higher antioxidant activity of EEP more research needs to be done.

The second step in this work was determination of bioavailability (percent of polyphenols resorbed in gastrointestinal tract) of solid propolis and its ethanolic extract. The bioavailability of propolis was determined after gastric and duodenal phase of digestion. Dialysis was used to simulate resorption of polyphenols. The concentration of polyphenols in the dialysis tube was measured before and after dialysis. Bioaccessibility of ethanolic extract in gastric phase was $35.76 \pm 0.08\%$ and in duodenal phase it was $38.21 \pm 0.16\%$. The percent of resorbed polyphenols of solid propolis in gastric phase was 52.2 ± 0.6 and in duodenal phase it was 63 ± 1 . It was shown that the bioaccessibility of polyphenols is higher in the last, duodenal, than in gastric phase of digestion.

This work is based on *in vitro* research of antioxidant activity and bioaccessibility of *in vitro* digested propolis. However, it is not known if there is a difference between biological activity of digested propolis in *in vivo* and *in vitro* systems.

