

# RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC

**Proiect Nr. PD 42/2020, acronim BIOPROP: “Efectele extractelor de propolis asupra membranelor lipidice bio-mimetice - o abordare biofizică avansată”, cod PN-III-P1-1.1-PD-2019-0778, perioada septembrie 2020 - decembrie 2020**

## Rezumatul etapei

Etapa I a Proiectului Nr. PD 42/2020, acronim BIOPROP: “Efectele extractelor de propolis asupra membranelor lipidice bio-mimetice - o abordare biofizică avansată”, pagina web: <http://proiecte.nipne.ro/pn3/19-proiecte.html> s-a desfășurat în cadrul celor 4 activități prevăzute în planul de realizare a proiectului. Prezentăm sintetic principalele rezultate obținute în cadrul acestei etape:

- A fost realizat un prim model al bazei de date în care vor fi stocate toate informațiile și rezultatele despre propolis obținute în cadrul proiectului;
- Au fost stabilite protocoalele de obținere a extractelor (hidro)alcoolice de propolis și a curbelor de calibrare care vor fi utilizate la determinarea principalilor constituenți din aceste extracte;
- A fost pusă la punct metoda de obținere a membranelor lipidice bio-mimetice și a fost testată stabilitatea acestor membrane;
- A fost realizată pagina web a proiectului.

## Descrierea științifică și tehnică

Execuția Etapei I – *Evaluari preliminare privind metodele de studiu ale extractelor (hidro)alcoolice de propolis* (2020) s-a desfășurat în acord cu planul de realizare a proiectului, în cadrul a 4 activități specifice, ceea ce a permis realizarea integrală a obiectivelor științifice și manageriale propuse în cadrul acestei etape.

### **Activitatea 1.1 – Studiul diversității fitogeografice în vederea selectării zonelor de colectare a mostrelor de propolis.**

Cel mai complex produs ce poate fi obținut din creșterea albinelor (*Apis mellifera*) este propolisul. Propolisul este produs de către albine, prin amestecarea rășinilor colectate de la plante, în special copaci, cu ceară și diverse substanțe secretate de albine (ex. salivă). *Compoziția chimică* a acestuia depinde de *arealul geografic, flora locală și zona climatică*.

Ținând cont de cele expuse anterior, la crearea modelului bazei de date dedicată propolisului trebuie avute în vedere câteva aspecte, care vor conduce, în final, la stabilirea unei corelații între compoziția chimică a propolisului și diversitatea fitogeografică a zonei/zonelor în care albinele și-au desfășurat activitatea. Astfel, vor fi salvate în baza de date informații referitoare la: intervalul de timp dintre două recoltări consecutive ale propolisului, locația/locațiile în care au fost montați stupii și durata de repaus a stupilor pentru fiecare locație (între cele două recoltări), speciile de copaci și pomi fructiferi (și dacă este posibil proporția acestora) care se regăsesc pe o rază de aproximativ 1,5 km de locul de repaus al stupilor.

### **Activitatea 1.2 – Testarea și validarea protocoalelor de obținere a extractelor (hidro)alcoolice de propolis.**

Propolisul brut este practic insolubil în apă, doar o mică fracție (< 10 %) putând fi dizolvată. Astfel, pentru o extracție a compușilor de interes și o separare cât mai optimă a impurităților, cum ar fi ceara, se folosește o soluție etanolică de concentrație 70 %. Protocolul utilizat la obținerea extractelor (hidro)alcoolice de propolis este descris în continuare:

- Propolisul brut se păstrează la o temperatură de – 20 °C; pentru prepararea extractului se prelevează o anumită cantitate din mostra congelată și, utilizându-se o râșniță electrică sau un mojar cu pistil, se rajnește/mojarează cantitatea prelevată până când aceasta se transformă într-o pulbere fină, formată din particule de propolis cu diametrul aproximativ cuprins în intervalul 10 – 80 μm;

- Pulberea astfel obținută se cântărește și se adaugă peste ea o cantitate de etanol 70 % (raportul între cantitatea de pudră de propolis și volumul de etanol trebuie să fie de aproximativ 1:30 w/v); suspensia obținută se pastrează pentru 24 h la temperatura camerei, în întuneric, cu agitare continuă; pentru realizarea unei extracții rapide se poate utiliza un echipament de ultrasonicare, suspensia sonicându-se timp de 20 min. la o temperatură constantă de 20 °C;
- Suspensia obținută la pasul anterior se filtrează utilizând hârtie de filtru și se repetă metoda de extracție utilizând fracția solidă recuperată de pe hârtia de filtru.
- Concentrația C a extractului de propolis, obținut din amestecarea celor două suspensii (hidro)alcoolice, se determină prin evaporarea în vid sau în flux de azot a unui volum de 2 ml până la uscarea completă; după uscarea completă se cântărește cantitatea  $m$  de propolis obținută, concentrația acestuia determinându-se utilizând formula:  $C = \frac{m}{2} \text{ mg/mL}$ .

Extractul (hidro)alcoolic de propolis obținut, utilizând protocolul descris anterior, poate fi păstrat, la temperatura de – 20 °C, sub formă de soluție sau se poate evapora în vid sau în flux de azot, pentru a putea fi utilizat în cadrul viitoarelor experimente.

Analiza cantitativă a principalelor componente fenolice prezente în propolis se poate face utilizând tehnici de spectroscopie de absorbție UV-VIS. Folosind această tehnică se pot determina următoarele grupe de fenoli: i) flavone și flavonoli, ii) flavanone și dihidroflavonoli și iii) conținutul total de fenoli. Pentru fiecare din aceste grupe, există metode și protocoale de determinare cantitativă standardizate:

- Conținutul total de flavone și flavonoli se măsoară spectrofotometric utilizând o metodă de complexare a clorurii de aluminiu; ca soluție de referință, pentru trasarea curbelor de calibrare standard, se folosește o suspensie de galangină dizolvată în metanol;
- Conținutul total de flavanone și dihidroflavonoli se măsoară spectrofotometric utilizând o metoda colorimetrică DAB9; ca soluție de referință, pentru trasarea curbelor de calibrare standard, se folosește o suspensie de pinocembrină dizolvată în metanol;
- Conținutul total de fenoli se determină spectrofotometric prin metoda Folin-Ciocalteu; ca soluție de referință, pentru trasarea curbelor de calibrare standard, se folosește o suspensie de pinocembrină:galangină (2:1 w/w) dizolvată în metanol.

### **Activitatea 1.3 – Testarea și validarea protocoalelor de obținere a membranelor bio-mimetice.**

Lipozomii reprezintă unul dintre tipurile de membrane lipidice model, fiind utilizați în practică pentru că utilizatorul poate controla compoziția, condițiile fizico-chimice, dimensiunile și forma membranei. Ei pot fi ușor preparați în laborator, din lipide naturale sau sintetice, sunt reproductibili, au o omogenitate ridicată și sunt stabili în timpul măsurătorilor. Membranele model pot fi utilizate, cu ușurință, pentru măsurători de spectroscopie UV-VIS și de fluorescență. Structural, lipozomii sunt vezicule sferice, în care un volum de substanță apoasă este complet închis de către un bistrat lipidic.

Metodele de obținere a lipozomilor, pentru experimentele de laborator, sunt:

- Metoda sonicării, prin care se obțin lipozomi cu diametrul de aproximativ 50 nm – SUV (Small Unilamellar Vesicles), distribuți uniform în suspensie;
- Metoda extrudării, prin care se obțin lipozomi cu diametrele între 50 nm și 1 μm – LUV (Large Unilamellar Vesicles), dimensiunile acestora fiind în funcție de filtrul folosit;
- Metoda electroformării, prin care se obțin lipozomi “gigant” – GUV (Giant Unilamellar Vesicles).

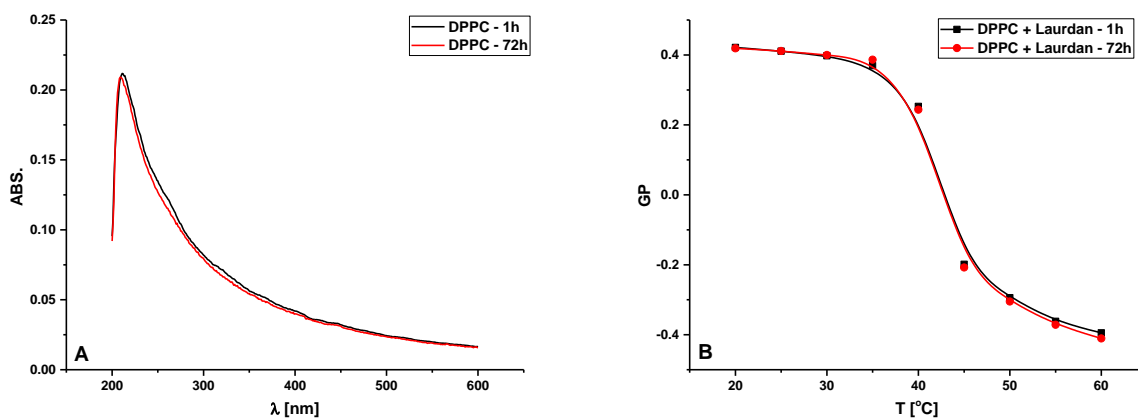
Din punct de vedere al structurii, lipozomii se împart în: vezicule unilamelare (ULV) – SUV, LUV și GUV, vezicule multilamelare (MLV), vezicule multicompartimentate (MVV) și vezicule oligolamelare (OLV).

Pentru experimentele care se vor desfășura pe durata de implementare a proiectului se vor prepara lipozomi unilamelari (LUV) cu diametrul de aproximativ 200 nm, utilizând o metoda de obținere descrisă la adresa <https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/luvet>, adaptată la condițiile existente în laborator. Lipidul utilizat la prepararea veziculelor unilamelare mari (LUV), folosite în cadrul

experimentelor din cadrul acestei activități, a fost DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolină) (Sigma-Aldrich). Lipozomii (LUV) au fost preparați prin metoda extrudării, această metodă constând, pe scurt, din urătoarele operații:

- Cantitatea necesară de lipide dizolvate în cloroform (12,5 mg/mL) a fost amestecată și uscată în flux de azot;
- Filmul de lipide format a fost hidratat cu PBS, încălzit la o temperatură mai mare decât temperatura de tranziție a lipidelor –  $T_m$  și agitat puternic; în urma acestor operațiuni a rezultat o suspensie de lipozomi multilamelari (MLV);
- Suspensia obținută a fost supusă la 5 cicluri de îngheț-dezghet și apoi extrudată (20 de treceri), printr-un filtru de policarbonat cu dimensiunea porilor de 200 nm, într-un extruder standard (Avanti Polar Lipids, Alabastre, AL, USA); extrudarea s-a efectuat la o temperatură mai mare decât  $T_m$ .

În final, a rezultat o suspensie de lipozomi unilamelari (LUV), cu diametrul situat în jurul valorii de 200 nm, concentrația moleculelor de lipid din soluție fiind de 50  $\mu$ M. Stabilitatea suspensiilor de lipozomi a fost verificată spectrofotometric (UV-VIS) și fluorimetric (utilizând o proba fluorescentă – Laurdan, care monitorizează fluiditatea bistratului lipidic), fiind comparate valorile absorbanței suspensiilor și cele ale polarizării generalizate (GP) a Laurdanului, imediat după prepararea suspensiei (1 h) și la un interval de 3 zile de la prepararea suspensiei (72 h), suspensia fiind păstrată în acest interval în recipiente de plastic, la temperatura de 4 °C. Rezultatele comparației pot fi observate în Figura 1.



**Figura 1.** Spectrele de absorbție UV-VIS a suspensiei de lipozomi (A) și polarizarea generalizată (GP) a Laurdanului inserat în bistratul lipidic (B).

Din graficele din figura anterioară se poate concluziona că lipozomii din suspensia obținută sunt stabili din punct de vedere fizico-chimic în intervalul de timp ales (72 h). Astfel, în cadrul experimentelor ce se vor desfășura în etapele viitoare ale proiectului, se vor utiliza membrane lipidice model obținute conform protocolului descris anterior.

#### **Activitatea 1.4 – Managementul proiectului.**

În cadrul activității de management a proiectului, Responsabilul de proiect a desfășurat activități de coordonare a achizițiilor de materiale necesare desfășurării activităților de cercetare din cadrul etapei în curs și a următoarelor etape, dar și menținerea permanentă a contactului cu compartimentul financiar-contabil pentru administrarea fondurilor disponibile în cadrul proiectului. De asemenea, a fost pregătit materialul pentru pagina web a proiectului, disponibilă la adresa <http://proiecte.nipne.ro/pn3/19-proiecte.html>.

Obiectivele prevăzute în cadrul activităților din Etapa I (2020) au fost îndeplinite.

**Director Proiect,**  
**Dr. Bogdan ZORILĂ**  
