

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 ianuarie 2021 - decembrie 2021

Rezumatul etapei

Etapa II 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 7 activități prevăzute în planul de realizare a proiectului. Prezentăm sintetic principalele rezultate obținute în cadrul acestei etape:

- A fost realizată colectarea locală, direct de la producător, a mostrelor de propolis; după colectare, mostrele de propolis brut au fost sortate și stocate în condiții controlate de laborator;
- Au fost preparate extractele (hidro)alcoolice din mostrele colectate și stocate în cadrul primei activități a acestei etape;
- Extractele (hidro)alcoolice de propolis au fost caracterizate, utilizând tehnici de spectroscopie optică (UV-VIS), în vederea obținerii cantităților (procentuale) de fenoli și flavonoide din compoziție;
- A fost dezvoltat și up-gradat modelul bazei de date în care sunt stocate toate informațiile referitoare la propolis, folosind informațiile și rezultatele experimentale obținute în cadrul acestei etape;
- A fost studiată interacția dintre componentele din compoziția extractelor de propolis și modelele de membrane lipidice utilizând spectroscopia optică UV-VIS;
- A fost studiată interacția dintre componentele din compoziția extractelor de propolis și modelele de membrane lipidice utilizând spectroscopia optică de fluorescență;
- A fost adus la zi conținutul paginii web dedicată proiectului; diseminarea rezultatelor s-a realizat prin participarea la o conferință internațională.

Descrierea științifică și tehnică

Execuția Etapei II – *Caracterizarea extractelor (hidro)alcoolice de propolis și studiul efectelor produse asupra membranelor bio-mimetice* (2021) s-a desfășurat în acord cu planul de realizare a proiectului, în cadrul a 7 activități specifice, ceea ce a permis realizarea integrală a obiectivelor științifice și manageriale propuse în cadrul acestei etape.

Activitatea 2.1 – Colectarea și stocarea, în condiții controlate, a mostrelor brute de propolis.

Pentru obținerea mostrelor de propolis brut, s-a luat legătura cu Societățile comerciale și filialele apicole din structura Asociației Crescătorilor de Albine din România (ACAR), lista acestor societăți fiind disponibilă la adresa web <https://www.aca.org.ro/wp-content/uploads/2019/07/Societatile-Comerciale-si-Filialele-apicole-din-structura-ACA-Romania-07.2019.pdf>.

Din păcate, colaborarea cu aceste sucursale ale ACAR a fost una fără rezultate satisfăcătoare pentru obiectivele proiectului, doar **două sucursale** (dintr-un total de **40 de sucursale**) oferind un răspuns afirmativ la solicitarea de vânzare/donație a unei cantități de aproximativ 50 – 100 g de propolis brut. Motivul principal pentru lipsa colaborării acestor sucursale este reprezentat de prețul de achiziție a propolisului de la apicultori, reglementat în cadrul ACAR la 200 LEI/kg, valoarea reală a acestuia fiind cuprinsă între 400 LEI/kg și 700 LEI/kg, în funcție de puritate (cantitatea de reziduuri lemnoase și de ceară, prezente în propolisul recoltat).

În urma colaborării defectuoase descrisă anterior, am luat decizia să folosesc rețelele social media pentru stabilirea de contacte în rândul apicultorilor înscriși în grupurile de discuții dedicate. În acest fel, a fost obținut un număr de 21 de mostre distincte de propolis brut.

Toate mostrele de propolis, obținute până în acest moment, au fost colectate prin raziire cu “daltă de propolis” de pe suporturile ramei, marginile cadrului și de pe scândurile inferioare sau din interiorul stupilor. Masa obținută în urma raziirii a fost amestecată pentru omogenizare și apoi compactată manual. O astfel de mostră de propolis brut poate fi observată în Figura 1.



Figura 1. Mostră de propolis brut.

Acolo unde a fost posibil mostrele de propolis au fost preluate direct de la apicultori (6 mostre), în restul cazurilor mostrele fiind trimise de către aceștia prin intermediul firmelor de curierat. Propolisul astfel obținut a fost sortat și stocat în pungi de polietilenă cu închidere ermetică. Pungile au fost etichetate (pe etichete fiind înscrise informațiile despre propolis necesare în cadrul proiectului) și depozitate pentru păstrare în congelator, la o temperatură de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Trebuie menționat că mostrele de propolis obținute în cadrul acestei activități sunt în totalitate mostre recoltate în timpul sezonului de producție a mierii (propolis proaspăt recoltat inter-sezon), campania de recoltare a propolisului fiind, în funcție de specificul climatic al zonei și de disponibilitatea fiecărui apicultor, de la începutul lunii septembrie până la sfârșitul lunii noiembrie.

Activitatea 2.2 – Prepararea extractelor (hidro)alcoolice de propolis.

Deoarece propolisul brut este practic insolubil în apă, doar o mică fracție ($< 10\%$) putând fi dizolvată, pentru extracția compușilor de interes și o separare cât mai optimă a impurităților, cum ar fi ceara, se folosesc soluții etanolice de concentrație 70% . Protocolul utilizat inițial (descriș în Etapa I – 2020) pentru obținerea extractelor (hidro)alcoolice de propolis a suferit modificări substanțiale, deoarece în urma testelor realizate, a rezultat că în suspensia obținută în urma extracției era prezentă o cantitate mult prea mare de ceară. Noul protocol de obținere a extractelor (hidro)alcoolice de propolis este descriș în continuare:

- Propolisul brut păstrat la temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se rade utilizând o răzătoare fină;
- Se separă din particulele obținute, în urma unei inspecții vizuale, pe cât posibil, reziduurile lemnoase ramase de la faza de recoltare;
- Propolisul ras se introduce iarăși în congelator pentru a-i scădea temperatura la $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pentru a ușura următoarea prelucrare mecanică la care va fi supus acesta, și anume râjnirea/mojararea, pentru obținerea unei pulberi cât mai fine;
- Pentru prepararea unui extract (100 mL de soluție (hidro)alcoolică) se utilizează o cantitate de 1 – 3 g de pulbere obținută anterior;
- Peste cantitatea de propolis cântărită anterior se adaugă, într-un balon cotat de 25 mL (Pyrex[®], Corning, Inc.), până la volumul marcat pe balon, alcool etilic (LiChrosolv[®], Merck KGaA, Darmstadt, Germany) pentru cromatografie (purație $\geq 99.9\%$); suspensia astfel obținută, se păstrează la o temperatură constantă ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$), cu agitare continuă (120 rpm), pentru 72 h;

- În primele 3 h, suspensia este tratată prin sonicare, într-o instalație de ultrasonicare (putere ultrasunete 80W), timp de 10 min, la intervale de 1 h; procedura se repetă la fiecare 24 h;
- După scurgerea celor 72 h ale primului interval de extracție, suspensia se filtrează în doi pași: primul pas este o filtrare grosieră, utilizând 5 bucăți suprapuse de pansament steril și al doilea pas utilizând hârtie de filtru cu diametrul porilor cuprins între 7-14 μm (Whatman[®], Cytiva);
- Se masoară volumul suspensiei filtrate și se ajustează cu apa ultrapură pentru obținerea unei concentrații alcoolice de 70 % (v/v);
- Deoarece puritatea alcoolului utilizat pentru extracția compușilor activi din propolis este foarte ridicată, acesta va solubiliza, pe lângă compușii de interes, și ceara prezenta în propolis; astfel, în momentul ajustării concentrației alcoolice a soluției utilizând apă ultrapură aceasta (ceara dizolvată) se va solidifica aproape instantaneu; soluția astfel obținută se lasă la agitat 30 min și se filtrează încă o dată prin hârtie de filtru; suspensia astfel obținută se notează “extract 1”;
- Reziduurile obținute în urma filtrării se resuspendă în 25 mL de alcool etilic 70 %, fiind ținute cu agitare continuă pentru încă 24 h; în primele 3 h ale acestui interval se efectuează pașii de sonicare a soluției, descriși anterior;
- După 24 h, suspensia se filtrează din nou în doi pași; suspensia rezultată în urma filtrării se amestecă cu soluția marcată “extract 1”; amestecul se notează “extract 2”;



Figura 2. Extract (hidro)alcoholic de propolis.

- Reziduuului rezultat în urma filtrării de la pasul anterior i se mai face încă o extracție timp de 24 h, în 25 mL de alcool etilic 70 %, ca la pasul anterior de extracție; după această

extracție, se aplică filtrarea în 2 pași; suspensia astfel obținută se amestecă cu soluția “extract 2” și se ajustează volumul final la 100 mL cu alcool etilic 70 %;

- Soluția obținută se filtrează cu ajutorul unui filtru pentru seringă, cu diametrul porilor de 0.22 μm (Millex[®], Merck KGaA, Darmstadt, Germany) și se obține astfel extractul (hidro)alcoolic de propolis, ca în Figura 2.

Pentru fiecare mostră de propolis au fost preparate câte trei extracte în paralel. Concentrația C a fiecărui extract de propolis (cantitatea de balsam sau propolis uscat) din soluțiile (hidro)alcoolice s-a obținut prin evaporarea, în triplicat, în flux de azot a unui volum de 2 ml până la uscarea completă; după uscarea completă s-a cântărit cantitatea *m* de propolis obținută, concentrația acestuia determinându-se utilizând formula: $C = \frac{m}{2} \text{ mg/mL}$. Concentrația finală a fost obținută din media aritmetică a celor trei măsurători. În urma extracțiilor efectuate, au fost obținute concentrații de balsam în intervalul 5.327 mg/mL – 18.351 mg/mL, în funcție de cantitatea inițială de pulbere de propolis utilizată pentru obținerea extractului dar și de cantitatea reziduurilor macroscopice și a cantității de ceară din fiecare probă. Valorile obținute se pot folosi la determinarea cantității de balsam (propolis pur) din fiecare mostră de propolis brut.

Extractele (hidro)alcoolice de propolis obținute, utilizând protocolul descris anterior, au fost păstrate sub formă de soluție la temperatura de – 20 °C pentru stocare, fracții din aceste soluții fiind păstrate la temperatura de + 4 °C pentru utilizare imediată. Soluțiile etanolice au fost marcate ca “EXTRACT A”, în paralel cu acestea preparându-se câte 50 mL de soluție metanolică de extract, folosind 1 mL de “EXTRACT A” și 49 mL de metanol; acestea au fost marcate în continuare ca “EXTRACT B”.

Activitatea 2.3 – Caracterizarea spectrofotometrică a extractelor (hidro)alcoolice de propolis.

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.

1. Determinarea conținutului total de flavone și flavonoli se face folosind ca soluție de referință o suspensie de galangină dizolvată în metanol. În continuare este descris protocolul experimental pentru obținerea curbei de calibrare.

- Se prepară 100 mL de soluție stoc de galangină (Supelco, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) în metanol de puritate cromatografică (LiChrosolv[®], Merck KGaA, Darmstadt, Germany); concentrația de galangină 32 μg/mL;
- Din soluția stoc de galangină se prepară o serie de diluții, în metanol, cu următoarele concentrații: 16, 8, 6.4 și 4 μg/mL;
- Se amestecă 1 mL din soluțiile stoc cu 10 mL de metanol și 0.5 mL soluție de clorura de aluminiu (AlCl₃ – 5 %, w/v) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) dizolvată în metanol;
- Suspensia obținută se ajustează la volumul de 25 mL cu metanol;
- Se lasă amestecul obținut la temperatura camerei pentru 30 min, după care se măsoară absorbanta fiecărui amestec la lungimea de undă de 425 nm;

Pentru obținerea curbei de calibrare se reprezintă valorile absorbantei în funcție de concentrația soluției standard exprimată în μg/mL; se obține astfel curba de calibrare reprezentată în Figura 3.

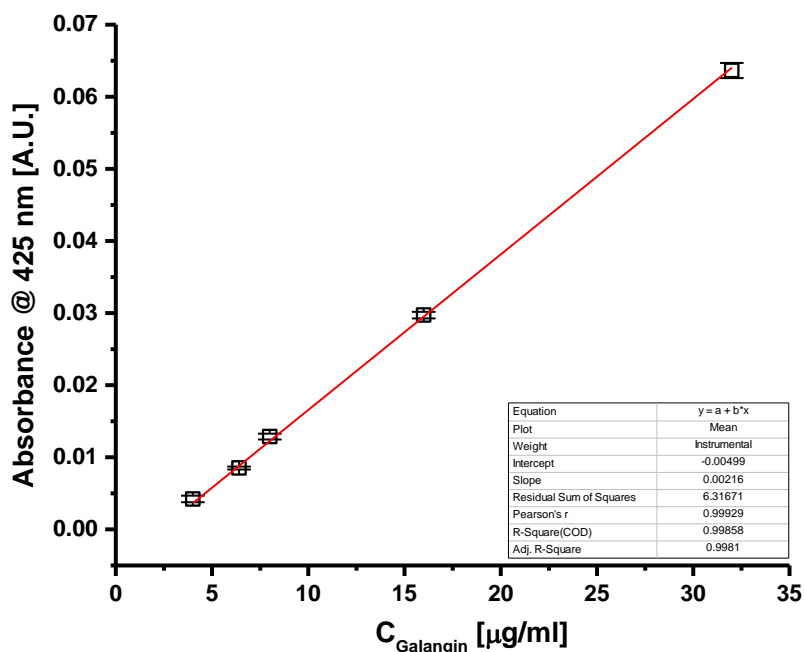


Figura 3. Curba de calibrare folosită la determinarea conținutului de flavone și flavonoli.

Pentru analiza extractului de propolis se folosește 1 mL din soluția de “EXTRACT B”, în locul soluției stoc de galangină. Pentru determinarea procentului de flavone și flavonoli din propolisul brut se folosește ecuația:

$$P = \frac{c * 50}{m} * 100\%$$

unde: P – procentul de flavone și flavonoli, c – concentrația de flavone și flavonoli din extractul de propolis, determinată folosind parametrii curbei de calibrare din Figura 3 și m – masa de balsam din fiecare extract.

2. Determinarea conținutului total de flavanone și dihidroflavonoli se face folosind ca soluție de referință o suspensie de pinocembrină dizolvată în metanol. În continuare este descris protocolul experimental pentru obținerea curbei de calibrare.

- Se prepară 10 mL de soluție stoc de pinocembrină (Supelco, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) în metanol; concentrația de pinocembrină 1.8 mg/mL;
- Din soluția stoc de pinocembrină se prepară o serie de diluții, în metanol, cu următoarele concentrații: 0.9, 0.45, 0.22 și 0.18 mg/mL;
- Se dizolvă 1 g de 2,4-dinitrofenilhidrazină (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) – DNP în 2 mL de acid sulfuric concentrat (H₂SO₄ – 96 %) (Suprapur[®], Merck KGaA, Darmstadt, Germany) și se diluează până la 100 mL cu metanol;
- Se amesteca 0.5 mL din soluțiile de referință cu 1 mL de soluție de DNP în metanol și se încălzește amestecul la 50 °C pe baie de apă, pentru 50 min;

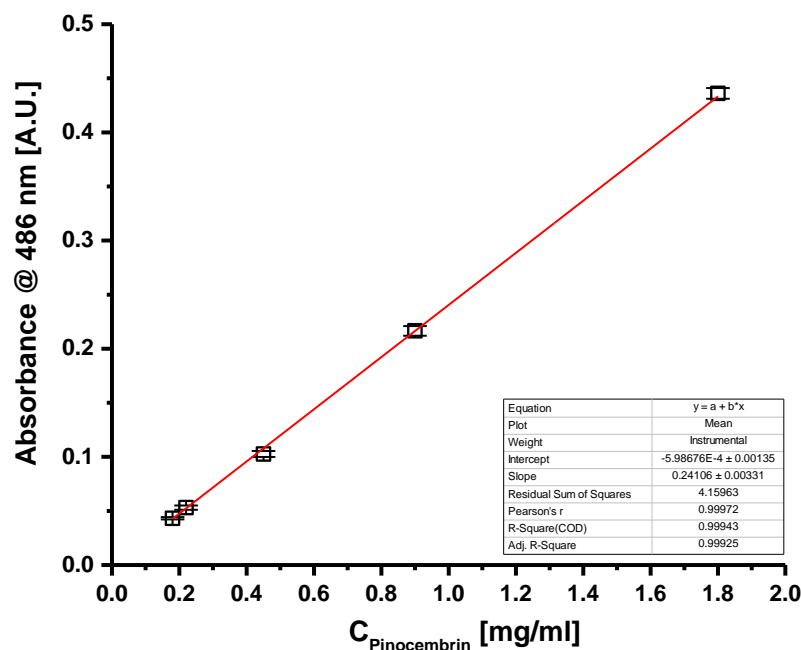


Figura 4. Curba de calibrare folosită la determinarea conținutului de flavanone și dihidroflavonoli.

- Se răcește amestecul până la temperatura camerei și se diluează până la 5 mL cu soluție de hidroxid de potasiu (KOH – 10 % w/v) (Emsure[®], Merck KGaA, Darmstadt, Germany) dizolvat în metanol;
- Din soluția obținută se amestecă 0.5 mL cu 10 mL de metanol, după care se diluează până la 25 mL cu metanol, după care se măsoară absorbanta fiecărui amestec la lungimea de undă de 486 nm;

Pentru obținerea curbei de calibrare se reprezintă valorile absorbantei în funcție de concentrația soluției standard exprimată în mg/mL; se obține astfel curba de calibrare reprezentată în Figura 4.

Pentru analiza extractului de propolis se folosesc 0.5 mL din soluția de “EXTRACT A”, în locul soluției stoc de pinocembrină. Pentru determinarea procentului de flavanone și dihidroflavonoli din propolisul brut se folosește ecuația:

$$P = \frac{c}{m} * 100\%$$

unde: P – procentul de flavanone și dihidroflavonoli, c – concentrația de flavanone și dihidroflavonoli din extractul de propolis, determinată folosind parametrii curbei de calibrare din Figura 4 și m – masa de balsam din fiecare extract.

3. Conținutul total de fenoli se determină spectrofotometric prin metoda Folin-Ciocalteu; ca soluție de referință se folosește o suspensie de pinocembrină:galangină (2:1 w/w) dizolvată în metanol. În continuare este descris protocolul experimental pentru obținerea curbei de calibrare.
 - Se prepară o soluție stoc de pinocembrină:galangină (2:1 w/w) prin dizolvarea a 2.2 mg de pinocembrină și 1.1 mg de galangină în 10 mL de metanol; concentrația finală a amestecului pinocembrină:galangină va fi de 330 μg/mL;
 - Din soluția stoc de pinocembrină:galangină se prepară o serie de diluții, în metanol, cu următoarele concentrații: 165, 82.5, 41.2 și 33 μg/mL;
 - Se amestecă 0.5 mL din soluțiile standard cu 7.5 mL apă ultrapură;
 - Peste suspensiile obținute se adaugă câte 2 mL de reactiv Folin-Ciocalteu (Supelco, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) și 3 mL de carbonat de sodiu (CNa₂O₃ – 20 % w/v) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) în apă ultrapură;

- Se completează suspensiile, obținute anterior, până la 25 mL cu apă ultrapură și se păstrează pentru 2 h (\pm 3 min) la temperatura camerei, după care se măsoară absorbanta acestora la lungimea de undă de 760 nm;

Pentru obținerea curbei de calibrare se reprezintă valorile absorbantei în funcție de concentrația soluției standard exprimată în $\mu\text{g/mL}$; se obține astfel curba de calibrare reprezentată în Figura 5.

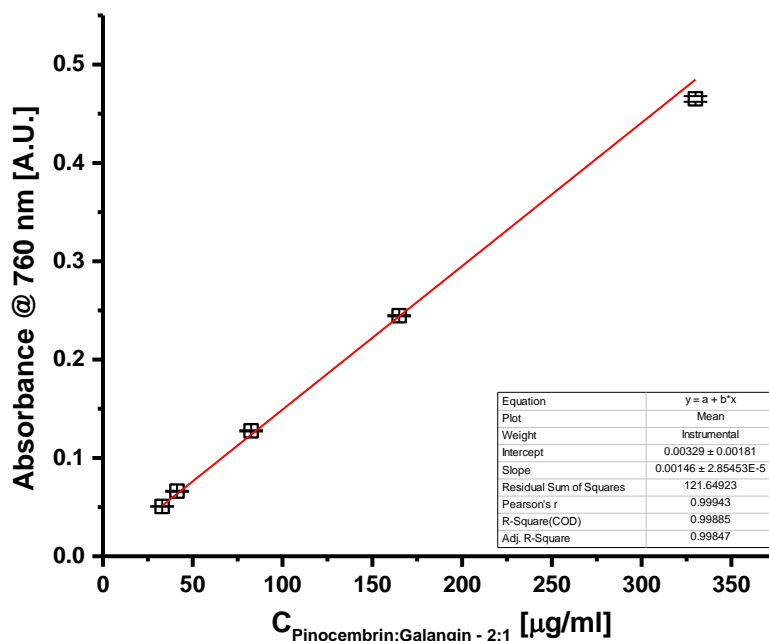


Figura 5. Curba de calibrare folosită la determinarea conținutului total de fenoli.

Pentru analiza extractului de propolis se folosesc 0.5 mL din soluția de “EXTRACT B”, în locul soluției stoc de pinocembrină:galangină. Pentru determinarea procentului de flavanone și dihidroflavonoli din propolisul brut se folosește ecuația:

$$P = \frac{c * 50}{m} * 100\%$$

unde: P – procentul de flavanone și dihidroflavonoli, c – concentrația totală de fenoli din extractul de propolis, determinată folosind parametrii curbei de calibrare din Figura 5 și m – masa de balsam din fiecare extract.

În Tabelul 1 sunt prezentați toți parametrii obținuți din curbele de calibrare pentru cele trei clase de fitocompuși. Acești parametri au fost apoi utilizați pentru determinarea procentelor totale

de flavone și flavonoli, flavanone și dihidroflavonoli și a conținutul total de fenoli din mostrele de propolis brut analizate.

Tabelul 1. Parametrii obținuți din fit-ul linear* al curbelor de calibrare

Standard**	a***	b***
Pinocembrină	$2.16 \cdot 10^{-3} \pm 4.70 \cdot 10^{-5}$	$-4.99 \cdot 10^{-3} \pm 4.42 \cdot 10^{-4}$
Galangină	$0.24106 \pm 3.31 \cdot 10^{-3}$	$-5.98 \cdot 10^{-4} \pm 1.35 \cdot 10^{-3}$
Pinocembrină:Galangină	$1.46 \cdot 10^{-3} \pm 2.85 \cdot 10^{-5}$	$3.29 \cdot 10^{-3} \pm 1.81 \cdot 10^{-3}$

* Ecuația regresiei lineare $A = a \cdot C_x + b$, unde A reprezintă absorbanta standardului și C_x concentrația acestuia

** Pentru toate standardele s-a obținut un coeficient de determinare R^2 al regresiei lineare > 0.99

*** Valorile a și b obținute în urma regresiei lineare \pm eroarea standard a acestor valori

Extractele (hidro)alcoolice de propolis, obținute din mostrele colectate, au fost analizate utilizând cele trei protocoale de lucru descrise anterior, rezultatele obținute pentru proporțiile celor trei clase de fitocompuși fiind prezentate în Tabelul 2.

Tabelul 2. Proporțiile celor trei clase de fitocompuși din mostrele de propolis analizate

Proba de propolis	Flavone și flavonoli [%] *	Flavanone și dihidroflavonoli [%] *	Total fenoli [%] *
P1 – IL, Andrasesti	7.56 ± 0.14	16.61 ± 0.36	54.22 ± 1.01
P2 – VS, Lipovăț	11.97 ± 0.95	21.46 ± 0.20	59.30 ± 0.76
P3 – GL, Vânători	10.23 ± 0.57	17.11 ± 0.19	43.22 ± 0.43
P4 – IL, Marsilienii	8.87 ± 0.36	17.23 ± 0.41	57.75 ± 0.89
P5 – MS, Târnăveni	10.29 ± 0.33	13.17 ± 0.46	48.21 ± 0.87
P6 – AG, Mioveni	11.89 ± 0.85	22.70 ± 0.27	61.39 ± 0.57
P7 – TR, Roșiori de Vede	8.71 ± 0.56	19.77 ± 0.31	47.17 ± 1.03
P8 – TR, Putineiu	6.24 ± 0.66	14.32 ± 0.87	37.01 ± 1.13
P9 – SM, Apa	10.19 ± 0.71	14.44 ± 0.93	42.17 ± 0.93
P10 – OT, Dăneasa	7.71 ± 0.79	12.49 ± 0.55	47.09 ± 0.85
P11 – CJ, Cluj-Napoca	8.80 ± 0.51	6.64 ± 0.17	31.01 ± 0.67
P12 – TL, Măcin	8.89 ± 0.13	11.93 ± 0.19	49.19 ± 0.55
P13 – BZ, Buzau	6.02 ± 0.15	11.13 ± 0.57	41.01 ± 0.77
P14 – BC, Mărginenii	9.18 ± 0.23	15.51 ± 0.26	53.97 ± 0.81
P15 – DB, Târgoviște	7.21 ± 0.16	8.71 ± 0.33	36.61 ± 0.89
P16 – CT, Murfatlar	9.98 ± 0.27	14.41 ± 0.27	46.21 ± 0.99
P17 – CL, Vâlcelele	6.26 ± 0.43	11.01 ± 0.51	38.98 ± 0.83
P18 – DJ, Bechet	6.22 ± 0.19	9.78 ± 0.37	41.07 ± 0.76
P19 – GR, Buturugeni	7.07 ± 0.27	8.83 ± 0.44	39.01 ± 0.65
P20 – GR, Giurgiu	6.03 ± 0.57	9.91 ± 0.41	32.16 ± 0.73
P21 – MH, Orșova	11.78 ± 0.13	23.13 ± 0.31	60.18 ± 0.41
P22 – IS, Iași	6.61 ± 0.18	7.75 ± 0.53	31.76 ± 0.92
P23 – IF, Vârteju	6.83 ± 0.67	8.79 ± 0.47	33.27 ± 0.78

* Media a trei măsurători \pm deviația standard

În literatura de specialitate sunt precizate limitele minime pentru procentele de fitocompuși din compoziția propolisului. Aceste limite sunt: pentru flavone și flavonoli procentul minim

acceptat este de 4 %, pentru flavanone și dihidroflavonoli procentul minim acceptat este tot de 4 %, iar pentru conținutul total de fenoli procentul minim trebuie să fie de 20 %.

Din analiza datelor obținute până în prezent se constată că toate mostrele de propolis respectă standardul minim pentru fitocompușii cu proprietăți bioactive din compoziția sa. De asemenea, începe să se contureze un anumit tipar al variabilității compoziției propolisului, în funcție de arealul geografic, flora locală și zona climatică. Din studiile realizate până în prezent, am constatat că pentru mostrele de propolis recoltate din locații care au în proximitate zone împădurite, proporția fitocompușilor din compoziția acestora este mai ridicată. Corelarea compoziției propolisului cu arealul geografic și, în principal, cu flora locală se va face în final utilizând resurse GIS (hărți topografice) și studii statistice referitoare la distribuția speciilor pomicole în teritoriu (ex. studiul finalizat în anul 2014, realizat în cadrul proiectului sectorial „ADER 1.1.13. „Zonarea sortimentelor de specii, portaltoaie și soiuri pe bazine pomicole, în funcție de condițiile pedoclimatice și socio-economice”).

Activitatea 2.4 – Up-grade-ul bazei de date în care sunt stocate informațiile despre propolis.

În urma discuțiilor purtate cu diverși apicultori și a studierii resurselor bibliografice disponibile, s-a stabilit că în structura bazei de date, pentru fiecare probă analizată, să fie salvate, pe lângă rezultatele experimentale obținute, următoarele informații:

- Locația unde este înregistrată stupina (“vatra stupinei”);
- Data de început și de sfârșit a intervalului de timp între momentul recoltării propolisului supus analizei și recoltarea anterioară;
- Un maxim de 5 câmpuri de date, corespunzătoare celor “5 campanii mari de recoltare a mierii”, care vor conține informații despre locație, momentul de început și de sfârșit al campaniei;
- Informații pentru identificarea geografică: județul și localitatea unde este înregistrată stupina.

Acolo unde informațiile de localizare a stupinei (locația de înregistrare și/sau locațiile de recoltare în campanie) nu sunt disponibile, se vor folosi, ca locație de referință pentru analiza datelor, informațiile geospațiale din motoarele publice de generare a hărților (ex. Google Maps).

Activitatea 2.5 – Studiul efectelor produse de extractele (hidro)alcoolice de propolis asupra membranelor bio-mimetice utilizând tehnici de spectroscopie optică.

Pentru studiul interacției între membranele bio-mimetice și extractele (hidro)alcoolice de propolis s-au folosit lipozomi preparați conform protocolului descris în Etapa I – Activitatea 1.3. Lipidele utilizate pentru prepararea lipozomilor au fost: DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolină), DPPG (1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-rac-(1-glicerol) sare de sodiu) și colesterol. Toate lipidele au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich. Veziculele unilamelare care imită membrana celulelor de mamifer au fost preparate dintr-un amestec de DPPC și colesterol într-un raport de 85:15 (mol:mol). În mod similar, veziculele unilamelare care imită membrana bacteriană au fost preparate dintr-un amestec de DPPC și DPPG într-un raport de 85:15 (mol:mol). Vezicule unilamelare, cu diametrul mediu 200 nm, au fost obținute prin extrudare, folosind un extruder standard (Avanti Polar Lipids). Concentrația finală de lipide a fost de 50 μM . Concentrația de propolis a fost variată între 0 și 100 $\mu\text{g/mL}$.

Pentru a studia interacția între fitocompuși din propolis și membranele bio-mimetice au fost măsurate inițial absorbanțele suspensiilor de lipozomi (curbele de culoare neagră din cele două grafice din Figura 6) și ale extractului de propolis în soluție apoasă salină – PBS (curbele de culoare roșie din aceleași grafice). Înregistrările s-au realizat utilizând un spectrofotometru UV-VIS-NIR model Jasco V-770, prin baleierea intervalului de lungimi de undă între 200 nm și 600 nm, cu pas de 1 nm și o viteză de 400 nm/min.

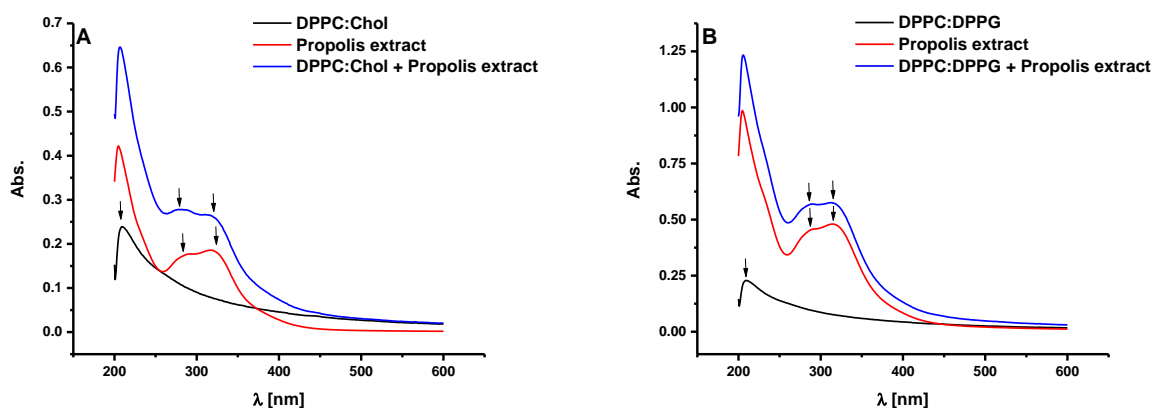


Figura 6. Spectrele de absorbție UV-VIS a suspensiei de lipozomi în soluție apoasă salină obținuți din DPPC:Colesterol (curba neagră – A) și DPPC:DPPG (curba neagră – B), extractul de propolis în soluție apoasă salină (curba roșie – A și B) și a amestecului de lipozomi obținuți din DPPC:Colesterol (curba albastră – A) și DPPC:DPPG (curba albastră – B) în prezența extractului de propolis.

Pe curbele corespunzătoare suspensiilor de lipozomi se observă peak-ul de împrăștiere a luminii pe veziculele unilamelare, în jurul lungimii de undă de 210 nm. Pentru curbele extractului de propolis sunt evidențiate în figura anterioară peak-urile caracteristice absorbției componentelor fenolice și a flavonoizilor.

Atunci când suspensia de lipozomi se află în prezența extractului de propolis (curbele de culoare albastră din cele doua grafice din Figura 6) se observă o creștere a valorilor absorbanței probei. Ce este important de observat din aceste doua grafice este faptul că poziția peak-urilor corespunzătoare componentelor fenolice și flavonoizilor (indicate cu săgeți pe cele doua grafice) nu își modifică poziția în spectru (doar amplitudinea acestora se modifică), acest lucru fiind un indicator al faptului ca la interacția dintre compușii prezenți în extractul de propolis și cele două tipuri de membrane lipidice nu apar modificari la nivelul grupărilor cromofore din structurile moleculare prezente în extract.

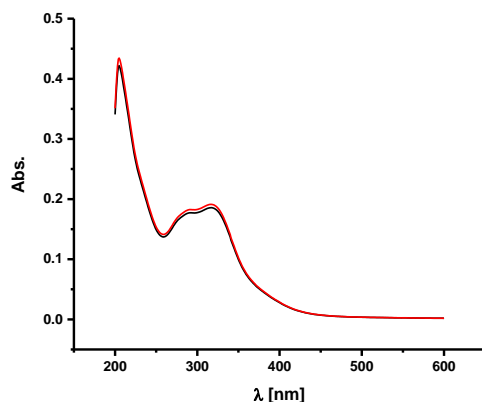


Figura 7. Spectrul de absorbție a extractului de propolis înregistrat în raport cu soluția apoasă salină (curba neagră) și spectrul de absorbție a amestecului de lipozomi cu extract de propolis înregistrat în raport cu suspensia de lipozomi (curba roșie).

Pentru a obține o confirmare suplimentară a rezultatelor experimentului anterior, au fost înregistrate și spectrele de absorbție a extractului de propolis în soluție apoasă salină (curba neagră din figura anterioară) în raport cu aceasta și a lipozomilor în prezența extractului de propolis (curba roșie) folosind ca soluție de referință o suspensie de lipozomi. După cum se poate observa din curbele reprezentate în graficul din Figura 7, absorbanțele celor două suspensii sunt aproape identice (diferențele care apar între cele două curbe se datorează în principal erorilor de pipetare și neomogenității locale a probelor analizate).

În urma experimentelor desfășurate în cadrul acestei activități a rezultat faptul că la interacția dintre compușii din componența extractelor de propolis și membranele bio-mimetice apar interacții

care nu duc la modificarea grupărilor cromofore ale structurilor moleculare din compoziția extractelor. Aceste interacții pot fi de natură hidrofobă în cazul lipozomilor obținuți din lipide neutre din punct de vedere electrostatic (DPPC:Chol) și/sau electrostatică, aceasta din urmă în cazul lipozomilor obținuți din lipide care prezintă sarcină electrostatică în zona capetelor hidrofile (DPPC:DPPG).

Activitatea 2.6 – Studiul efectelor produse de extractele (hidro)alcoolice de propolis asupra membranelor bio-mimetice utilizând tehnici de spectroscopie de fluorescență.

Interacțiile care apar între fitocompuții din extractele (hidro)alcoolice de propolis și membranele bio-mimetice s-au pus în evidență ca urmare a modificărilor de fluiditate membranară care apar la nivelul bistratului lipidic. În cadrul acestei activități, fluiditatea membranelor lipidice a fost evaluată prin două metode. Lipozomii folosiți în aceste experimente au fost la fel ca cei de la experimentele de spectroscopie optică UV-VIS.

Fluiditatea membranei a fost analizată măsurând anizotropia fluorescenței a doi fluorofori: TMA-DPH și DPH. TMA-DPH a fost dizolvat în metanol și DPH a fost dizolvat în tetrahidrofuran la concentrații de 1 mM. Lipozomii (50 μM) au fost incubati cu TMA-DPH sau DPH la o concentrație finală de 1 μM timp de 20 min la 25 °C în PBS, pH 7.4, iar valorile anizotropiei fluorescenței au fost înregistrate în absența și în prezența extractelor de propolis, folosind un spectrofluorimetru FluoroMax-3 (Horiba Jobin Yvon). Rezultatele sunt prezentate ca raport r/r_0 , unde r este anizotropia fluorescenței în prezența extractului, iar r_0 este anizotropia fluorescenței în absența extractului. Lungimile de undă de excitare și emisie au fost de 340 nm și 430 nm (pentru TMA-DPH) și, respectiv, 348 și 426 nm (pentru DPH).

Fluoroforul Laurdan a fost dizolvată în DMSO, la o concentrație de 1 mM. După incubarea membranelor lipozomale (50 μM) în PBS, pH 7.4, în prezența 0.2 μM de Laurdan, timp de 15 minute la 37 °C, pentru a permite încorporarea acestuia în membrană, a fost înregistrată fluorescența folosind spectrofluorimetrul FluoroMax-3 (Horiba Jobin Yvon).

Polarizarea generalizată (GP) a Laurdan a fost calculată folosind ecuația:

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}}$$

unde I_{440} este intensitatea fluorescenței la lungimea de undă de 440 nm și I_{490} este intensitatea fluorescenței la lungimea de undă de 490 nm. Lungime de undă de excitare a fost de 378 nm. Fluorescența Laurdanului este sensibilă la polaritatea mediului și reflectă modificările de fază care

apar la nivelul bistratului lipidic. Variațiile conținutului de apă din membrană provoacă modificări în spectrele de fluorescență a Laurdanului, care sunt cuantificate prin calcularea polarizării generalizate – GP.

Modificările fluidității membranelor lipidice în prezența extractelor de propolis au fost determinate prin măsurarea intensității fluorescenței și a anizotropiei fluorescenței TMA-DPH și DPH, ambele molecule lipofile, cu localizări diferite la nivelul bistratului. TMA-DPH este situată la interfața membrană lipidică/solvent, iar DPH este situată în zona hidrofobă a bistratului ocupată de grupările acil ale lipidelor. Anizotropia fluorescenței acestor fluorofori este proporțională cu rigiditatea și gradul de împachetare a lipidelor din bistrat.

În Figura 8 sunt prezentate variațiile rapoartelor r/r_0 pentru TMA-DPH și DPH, atunci când sunt inserate în cele două tipuri de membrane lipidice DPPC:Chol și DPPC:DPPG. Creșterea valorilor acestui raport indică o scădere a fluidității bistratului lipidic (creștere a ordinii lipidelor) atât la interfața solvent/membrană lipidică, cât și în zona hidrofobă a bistratului (cozile lipidelor). Pentru ambele cazuri (tipuri de lipozomi), efectele extractelor de propolis sunt mai pronunțate în cazul TMA-DPH.

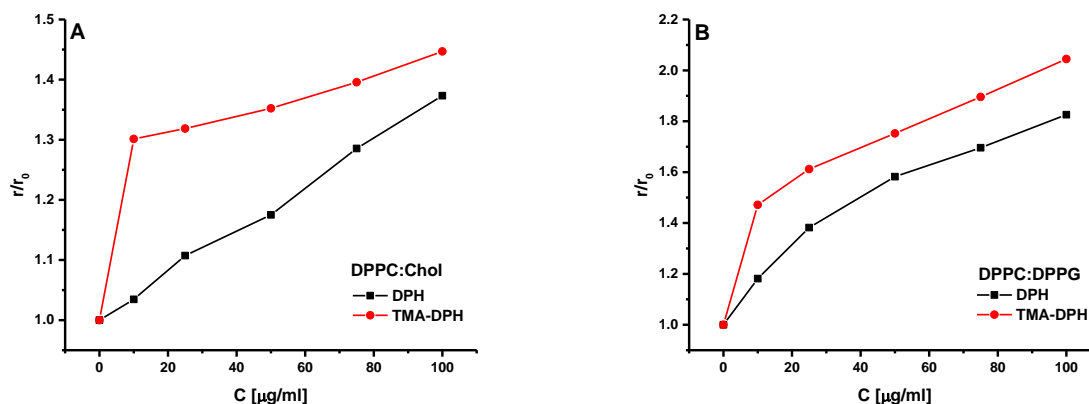


Figura 8. Variațiile rapoartelor r/r_0 pentru TMA-DPH și DPH, inserate în lipozomi preparați din DPPC:Chol (A) și DPPC:DPPG (B).

Se știe că modificările polarizării generalizate (GP) a Laurdanului sunt asociate cu modificările fluidității membranei lipidice și a hidratării lipidelor la interfața solvent/bistrat a lipozomilor. După cum se poate observa în Figura 9, efectele extractelor de propolis asupra membranelor lipidice au fost semnificativ diferite pentru cele două tipuri de lipozomi. În cazul lipozomilor preparați din DPPC:Chol, fitocompuși prezenți în extract au scăzut valorile GP-ului, indicând o tranziție de fază a bistratului lipidic, de la o stare solidă (mai ordonată) către o stare mai fluidă (mai dezordonată). Diferit față de aceștia, în cazul lipozomilor preparați din

DPPC:DPPG, adăugarea unor cantități crescătoare de extract de propolis în suspensie a dus la o ușoară rigidizare a bistratului lipidic.

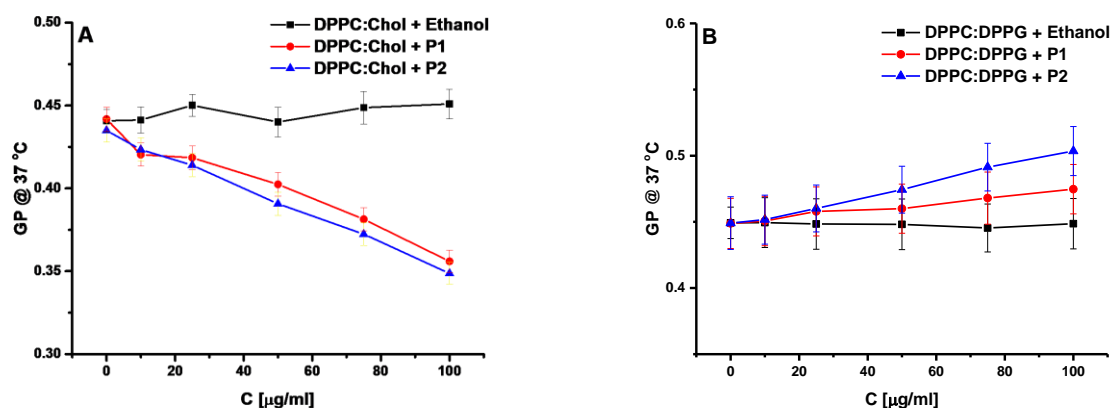


Figura 9. Variație GP pentru fiecare combinație extract de propolis - tip membrană: (A) negru - DPPC:Chol + Etanol (70%) – folosit ca referință, roșu – DPPC:Chol + P1, albastru – DPPC:Chol + P2; (B) negru - DPPC:DPPG + Etanol (70%) – folosit ca referință, roșu – DPPC:DPPG + P1, albastru – DPPC:DPPG + P2.

Rezultatele obținute din măsurarea anizotropiei TMA-DPH și DPH au indicat faptul că fitocompuși din extractele de propolis au interacționat în mod direct cu membrana lipidică, pentru ambele tipuri de lipozomi, într-un mod direct dependent de cantitatea de extract prezentă în suspensie, scăzând în funcție de aceasta cantitate microfluiditatea bistratului (i-au crescut rigiditatea), la mai multe adâncimi ale acestuia. Efectul este mai pronunțat în cazul lipozomilor care prezintă sarcină electrostatică pe suprafața lor (preparați din DPPC:DPPG) decât în cazul lipozomilor neutri din punct de vedere electrostatic.

Din experimentele în care a fost determinată polarizarea generalizată a Laurdanului, a rezultat că fitocompușii din extracte au afectat în mod diferit bistratul lipidic neutru din punct de vedere electric, inducând o tranziție de la starea solidă (ordonată) la starea lichidă (dezordonată) la interfața solvent/bistrat lipidic și a crescut hidratarea acestuia în această zonă (mai multe molecule de apă au putut să se încorporeze la interfața hidrofob-hidrofilă a bistratului). O comportare diferită a rezultat în cazul lipozomilor preparați din DPPC:DPPG, în prezența fitocompușilor bistratul lipidic devenind mai rigid și mai puțin accesibil moleculelor solventului.

Din experimentele efectuate în cadrul acestei activități a rezultat, pentru ambele tipuri de bio-membrane, o creștere a heterogenității membrane lipidice datorită distribuției fitocompușilor în interiorul și pe suprafața acesteia.

Activitatea 2.7 – Managementul proiectului și diseminarea rezultatelor.

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 următoarei etape, dar și menținerea permanentă a contactului cu compartimentul financiar-contabil pentru administrarea fondurilor disponibile în cadrul proiectului. De asemenea, au fost pregătite materialele pentru pagina web a proiectului, disponibilă la adresa <http://proiecte.nipne.ro/pn3/19-proiecte.html>.

Activitatea de diseminare a rezultatelor s-a concretizat prin participarea la conferința internațională 13th International Conference Processes In Isotopes And Molecules – PIM 2021, cu lucrarea tip poster “Effects of propolis extracts on model membranes”. De asemenea, Responsabilul de proiect a participat la un cursul on-line 18th International Course on “Principles & Applications of Time-resolved Fluorescence Spectroscopy”, organizat de PicoQuant GmbH. Datele experimentale obținute în cursul prezentei etape a proiectului împreună cu datele obținute în cursul primei activități prevăzute în următoarea etapă a proiectului vor face obiectul unui articol științific care va fi publicat într-un jurnal de specialitate.

Obiectivele prevăzute în cadrul activităților din Etapa II (2021) au fost îndeplinite.

Director Proiect,
Dr. Bogdan ZORILĂ

