

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
Departamentul III Științe Funcționale**

**DUCA ALEXANDRA**



# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**CONTRIBUȚII LA CARACTERIZAREA EXPERIMENTALĂ A  
UNOR VARIETĂȚI INDIGENE DE PROPOLIS**

## **REZUMAT**

Conducători științifici:

**Prof. Univ. Dr. MUNTEAN MIRELA-DANINA**

**Prof. Univ. Dr. ALEXA ERSILIA-CĂLINA**

Timișoara  
2019

## CUPRINS

<b>PARTEA GENERALĂ.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITOLUL I. Compoziția chimică a propolisului .....</b>	<b>2</b>
<b>CAPITOLUL II. Aplicațiile propolisului în medicină .....</b>	<b>20</b>
<b>PARTEA SPECIFICĂ.....</b>	<b>36</b>
<b>CAPITOLUL I. MATERIALE ȘI METODE .....</b>	<b>37</b>
I.1.CARACTERIZAREA PROPOLISULUI BRUT....	37
I.1.1. Evaluarea profilului lipidic.....	38
I.1.2. Determinarea conținutului de proteine.....	39
I.1.3. Determinarea conținutului mineral.....	40
I.1.4. Determinarea conținutului de apă.....	40
I.1.5. Determinarea conținutului de zaharuri reducătoare.....	40
I.1.6. Determinarea valorii energetice .....	41
I.2. PREPARAREA ȘI CARACTERIZAREA CHIMICĂ A UNOR EXTRACTE APOASE ȘI ETANOLICE DE PROPOLIS .....	42
I.2.1. Evaluarea profilului polifenolic.....	42
I.2.2. Determinarea reziduului sec și a randamentului de extracție.....	43
I.2.3. Determinarea calitativă a saponozidelor.....	44
I.3. CARACTERIZAREA BIOLOGICĂ A EXTRACTELOR DE PROPOLIS .....	44
I.3.1. Evaluarea <i>in vitro</i> a activității antioxidante.....	44
I.3.2. Determinarea <i>in vitro</i> a activității antibacteriene.....	45
I.3.3. Evaluarea comparativă a activității antitumorale a propolisului, quercetinei și acidului rozmarinic la nivelul celulelor de cancer de colon (Caco-2) și melanom malign uman (A375).....	46
I.4. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA ULEIULUI VOLATIL ȘI A APEI AROMATICE DE PROPOLIS .....	48
I.5. FORMULAREA ȘI CARACTERIZAREA UNOR MICROPARTICULE POLIMERICE CU PROPOLIS .....	49
<b>CAPITOLUL II. REZULTATE ȘI DISCUȚII .....</b>	<b>51</b>
<b>CONCLUZII GENERALE .....</b>	<b>118</b>
<b>BIBLIOGRAFIE .....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXE .....</b>	<b>I</b>

**CUVINTE CHEIE:** propolis, extracte apoase, extracte etanolice, polifenoli, resveratrol, citranelol, activitate antioxidantă, acțiune antimicrobiană, acțiune antitumorală, linii celulare, melanom malign, neoplasm de colon, ulei volatil de propolis, apă aromatică, microstructuri poliuretanic.

## I. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

Propolisul a fost utilizat încă din antichitate în medicina empirică, iar interesul pentru utilizarea sa în scop curativ a crescut considerabil prin demonstrarea științifică a acțiunilor sale terapeutice. În ultimele decenii cercetările privind compoziția propolisului corelate cu acțiunile sale terapeutice au cunoscut un progres spectaculos odată cu interesul pentru apiterapie alături de fitoterapie ca abordări terapeutice adjuvante medicinei clasice. În prezent, studiile efectuate pe diferite modele experimentale sunt adresate identificării componentelor responsabile pentru efectele terapeutice ale propolisului într-o gamă variată de patologii și, respectiv, pentru caracterizarea mecanismelor de acțiune ale acestuia.

Propolisul reprezintă, în principal, o sursă importantă de polifenoli considerați a fi responsabili de proprietățile sale terapeutice antitumorale/citotoxice, antioxidante, antibacteriene, antifungice, antivirale, antiinflamatoare, pentru a menționa doar câteva dintre acestea.

Caracteristicile geografice ale zonei de proveniență a propolisului influențează compoziția chimică a acestuia și ca atare, activitățile sale biologice. Astăzi este binecunoscut faptul că un anumit efect terapeutic poate fi determinat de constituenți chimici diferiți ai propolisului. Pe de altă parte, dependent de compoziție, propolisul poate prezenta preponderent anumite acțiuni terapeutice. Ca și în cazul fitocompușilor, tot mai multe studii sugerează faptul că efectele propolisului sunt rezultatul acțiunii sinergice și de potențare reciprocă a constituenților săi.

Prezenta lucrare a avut drept scop caracterizarea sistematică a compoziției chimice și a acțiunilor biologice *antioxidantă, antibacteriană și antitumorală* a unor varietăți indigene de propolis din partea de vest a României. În ceea ce privește aceasta din urmă, eficacitatea propolisului românesc a fost testată *in vitro* doar în cazul cancerului de sân; ca atare, în prezenta teză au fost investigate în premieră efectele antitumorale ale acestuia la nivelul a două linii celulare maligne umane, de melanom și, respectiv, cancer de colon. În plus, s-a dorit obținerea unor extracte bogate în principii active în scopul introducerii acestora în noi formulări farmaceutice cu potențială acțiune terapeutică și/sau profilactică.

**Obiectivele cercetării** au constat în:

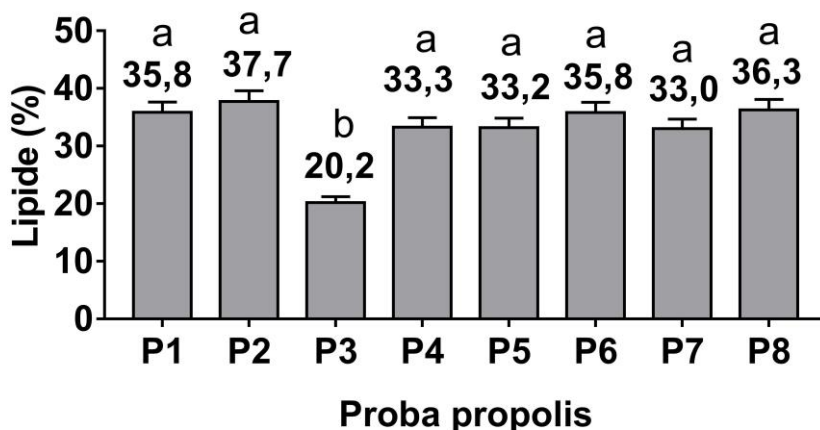
1. Caracterizarea chimică complexă a opt eșantioane de propolis recoltate din zona de vest a României.
2. Evaluarea *in vitro* a activității antioxidante, antibacteriene și antitumorale a extractelor de propolis.
3. Obținerea și caracterizarea unor forme farmaceutice moderne pe bază de extracte de propolis.

## II. CARACTERIZAREA PROPOLISULUI BRUT DIN PARTEA DE VEST A ȚĂRII

Materialul luat în studiu a constat în opt probe de propolis (P1-P8) din județele: Bihor, Caraș-Severin, Arad, Satu-Mare și Timiș, recoltate în anii 2015 (P1→P6) și 2016 (P7, P8).

Caracterizarea propolisului a constat în: evaluarea profilului lipidic, proteic, mineral, determinarea conținutului de apă, glucide și calcularea valorii energetice. Compoziția chimică a fost corelată cu activitatea biologică, iar probele de propolis au fost clusterizate pe baza similarității profilului lipidic, proteic și mineral, prin analiza componentelor principale.

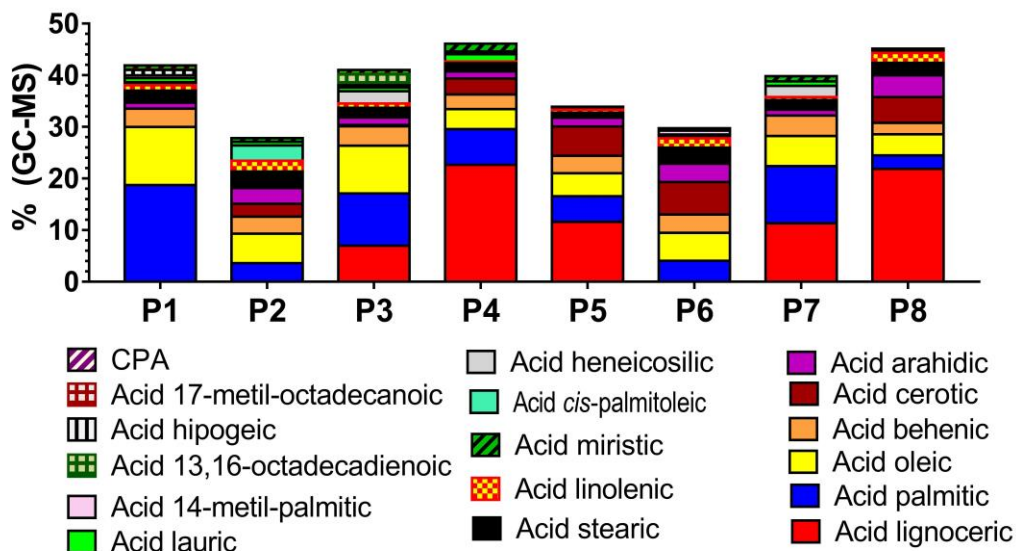
**II.1. Lipidele** au fost extrase din propolis folosind un echipament Soxtest, după care s-a stabilit profilul acizilor grași prin gaz-cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS). Conținutul de lipide din propolis a variat între 20,20% și 37,73% (Fig. 1).



**Figura 1. Conținutul de lipide totale la nivelul eșantioanelor de propolis.**

(Diferențele semnificative dintre valori sunt ilustrate prin litere distincte;  $p < 0,01$ , Tukey).

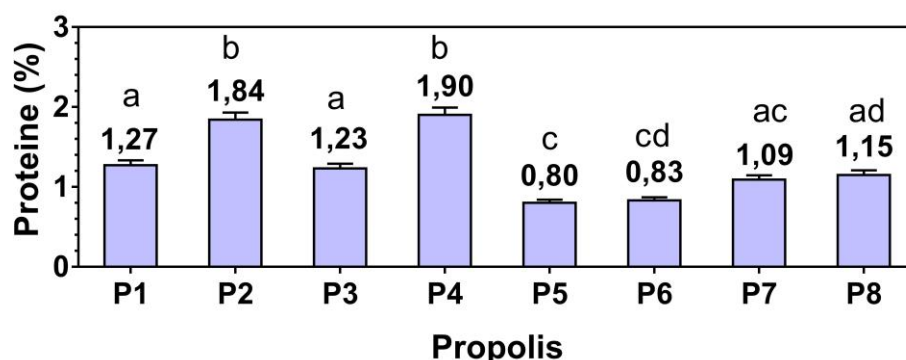
Au fost identificați 17 acizi grași în propolis, majoritatea fiind saturați; dintre aceștia au predominat acidul lignoceric, palmitic, behenic, cerotic, arahidic și stearic. Acizii nesaturați identificați au fost reprezentați de: acidul oleic,  $\alpha$ -linolenic, *cis*-palmitoleic, acidul 13,16-octadecadienoic și, respectiv, acidul hipogeic. Toate probele de propolis au conținut: acid palmitic, oleic, behenic, arahidic, stearic,  $\alpha$ -linolenic, miristic și lauric (Fig. 2).



**Figura 2. Distribuția acizilor grași identificați la nivelul eșantioanelor de propolis.**

(CPA=acid 2-undecil-ciclopropanpentanoic).

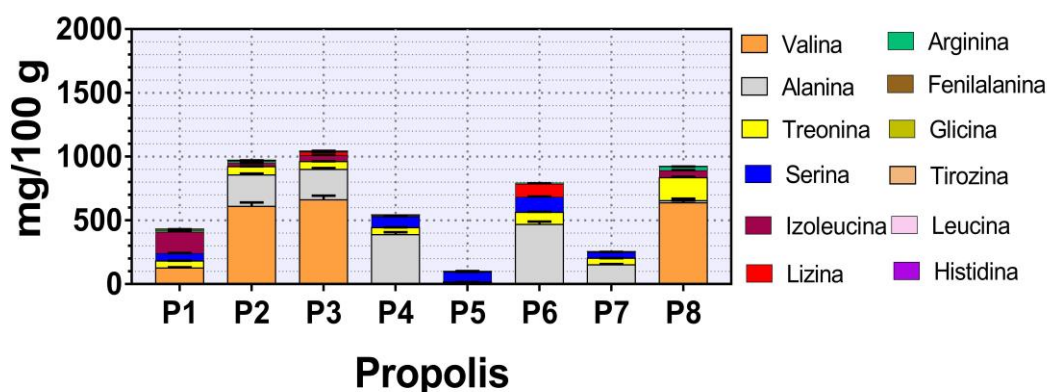
**II.2. Proteinele** au fost dozate prin metoda Kjeldahl, iar aminoacizii prin cromatografie de schimb ionic. Conținutul proteic a variat între 0,80 și 1,90% (Fig. 3).



**Figura 3. Conținutul în proteine al eșantioanelor de propolis.**

(Diferențele semnificative statistic dintre valori sunt exprimate prin litere distincte,  $p < 0,05$ , Tukey).

Au fost identificați 12 aminoacizi în propolis: valina, alanina, treonina, serina, izoleucina, lizina, arginină, fenilalanină, glicină, tirozină, leucină și histidină (Fig. 4).



**Figura 4. Profilul aminoacizilor identificați în eșantioanele de propolis.**

Aminoacizii alifatici mono-amino mono-carboxilici, valina (aminoacid esențial) și alanina, s-au regăsit în concentrație mare în unele probe de propolis. Concentrația valinei în propolis a variat între 125,99 mg/100 g (P1) și 660,70 mg/100 g (P3).

**II.3. Conținutul de substanțe minerale** totale s-a determinat prin calcinare și a variat între 0,53% și 2,04%. Elementele minerale individuale au fost dozate prin spectroscopie de absorbție atomică:  $K > Fe > Ca > P > Mg > Zn > Pb > Mn > Cr > Cu > Ni > Cd$  (Fig. 5).

Potasiul a reprezentat principalul macroelement detectat în propolis, fiind urmat de calciu și fosfor. Dintre microelemente au predominat fierul și zincul. În ceea ce privește valoarea nutritivă minerală a propolisului, luând în considerare necesarul zilnic la adult, se remarcă un conținut foarte ridicat de fier, zinc, crom și mangan, respectiv un conținut mai redus în fosfor.

În urma analizei cluster, s-a observat un profil mineral distinct pentru probele P2 și P3. Proba P2 s-a remarcat printr-un conținut mineral mai ridicat comparativ cu restul probelor (inclusiv de plumb), iar proba P3 a conținut cantitatea maximă de mangan (22,37 mg/100 g).

Elementele minerale toxice se pot regăsi în propolis ca urmare a poluării mediului înconjurător.

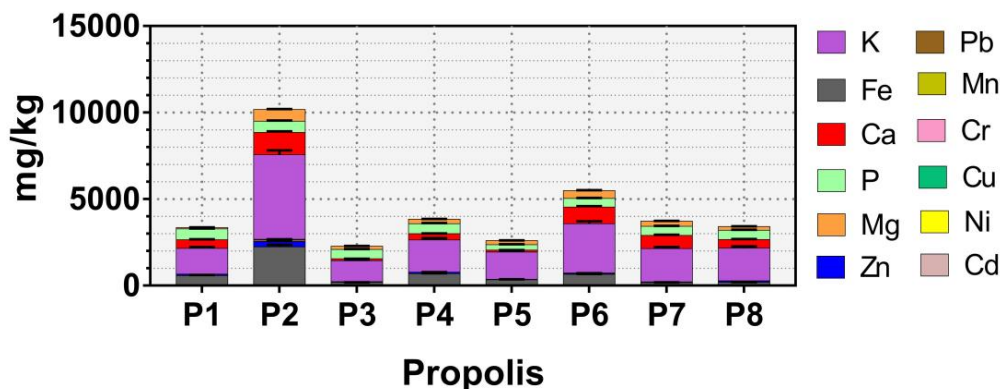


Figura 5. Elementele minerale identificate la nivelul eşantioanelor de propolis.

### III. PREPARAREA ȘI CARACTERIZAREA CHIMICĂ A EXTRACTELOR APOASE ȘI ETANOLICE DE PROPOLIS

Extractele de propolis au fost preparate utilizând ca solvent etanolul 60% (v/v), respectiv apa distilată (1:20). Randamentul de extracție a fost de  $40,26 \pm 3,49\%$  pentru extractele etanolice, respectiv de  $5,18 \pm 2,16\%$  pentru cele apoase. S-au făcut ulterior diluții suplimentare pentru caracterizarea extractelor.

Polifenolii totali au fost dozați prin metoda Folin-Ciocalteu (Fig. 6), iar cei individuali (acid galic, acid protocatechuic, acid cafeic, epicatechină, acid *p*-cumaric, acid ferulic, rutin, acid rozmarinic, resveratrol, quercetină și kaempferol) prin LC-MS (Fig. 7).

Extractele etanolice de propolis au conținut o cantitate mult superioară de polifenoli ( $213,92 \pm 48,38$  mg GAE/g propolis), comparativ cu cele apoase ( $7,85 \pm 3,15$  mg GAE/g). Kaempferolul, quercetina, resveratrolul și acidul rozmarinic au predominat în probele analizate. Extractele apoase au conținut în special quercetină, iar cele etanolice, kaempferol.

Resveratrolul a fost identificat *în premieră* în propolisul românesc, concentrația acestuia variind între  $4,90 \mu\text{g/mL}$  (P6) și  $188,50 \mu\text{g/mL}$  (P7) în extractele etanolice.

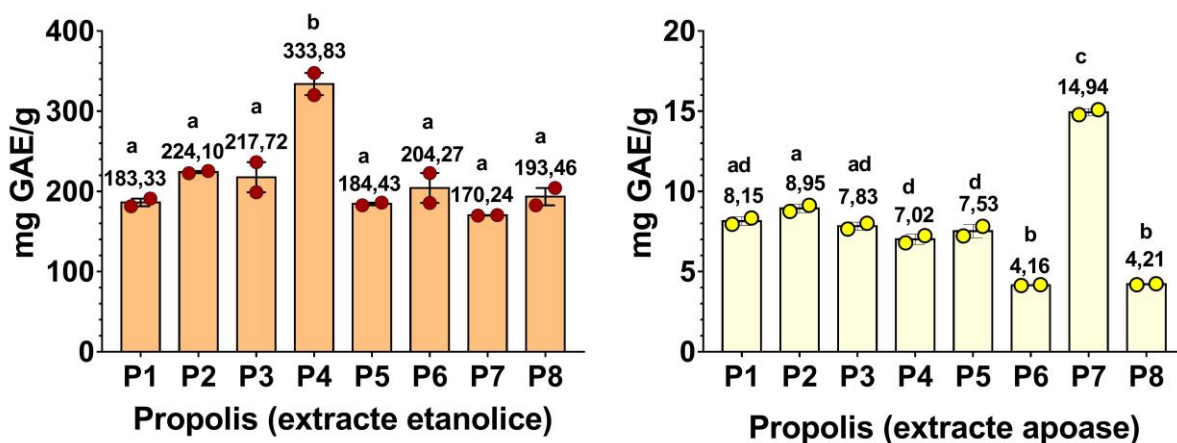
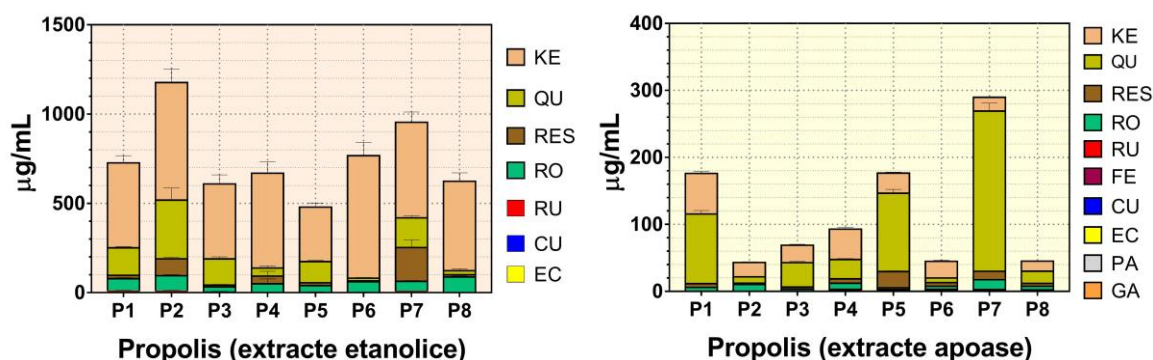


Figura 6. Cantitatea de polifenoli totali din extractele etanolice și apoase de propolis.  
(Diferențele semnificative dintre valorile sunt exprimate prin litere distincte,  $p < 0,05$ , Bonferroni).





**Figura 7. Determinarea cantitativă a compușilor (poli)fenolici în extractele etanolice (stg.) și apoase (dr.) de propolis.**

(KE=kaempferol, QU=quercetină, RES=resveratrol, RO=acid rozmarinic, RU=rutin, FE=acid ferulic, CU=acid p-cumaric, EC=epicatechină, PA=acid protocatechuic, GA=acid galic).

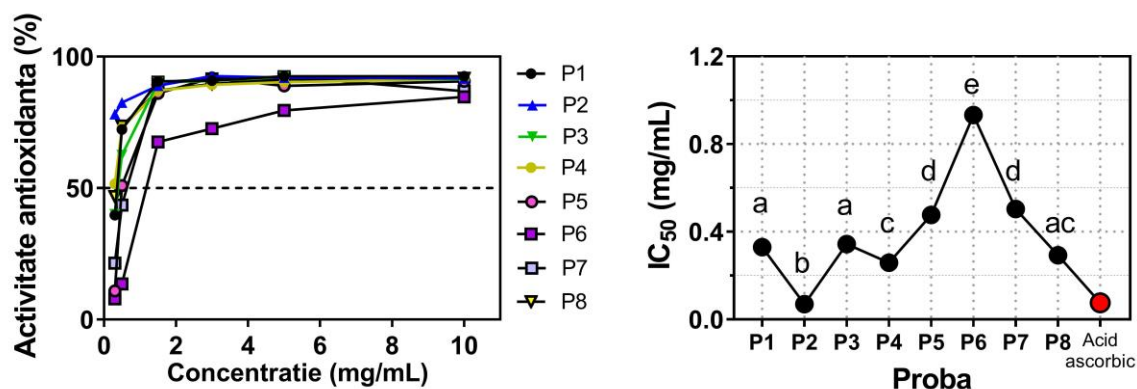
## IV. CARACTERIZAREA BIOLOGICĂ A EXTRACTELOR DE PROPOLIS

### IV.1. Evaluarea ACTIVITAȚII ANTIOXIDANTE a propolisului

Studiul de față a evaluat capacitatea antiradicalară a extractelor etanolice de propolis, deoarece acestea au avut un conținut polifenolic mult mai ridicat față de cele apoase, scopul cercetării fiind obținerea unor extracte bogate în principii active cu activitate biologică reprezentativă.

Activitatea antioxidantă a extractelor de propolis a fost evaluată prin două metode spectrofotometrice: DPPH, metoda ce implică radicalul 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (Fig. 8) și, respectiv, FOX (*Ferrous Iron Oxidation*) – Fig. 9.

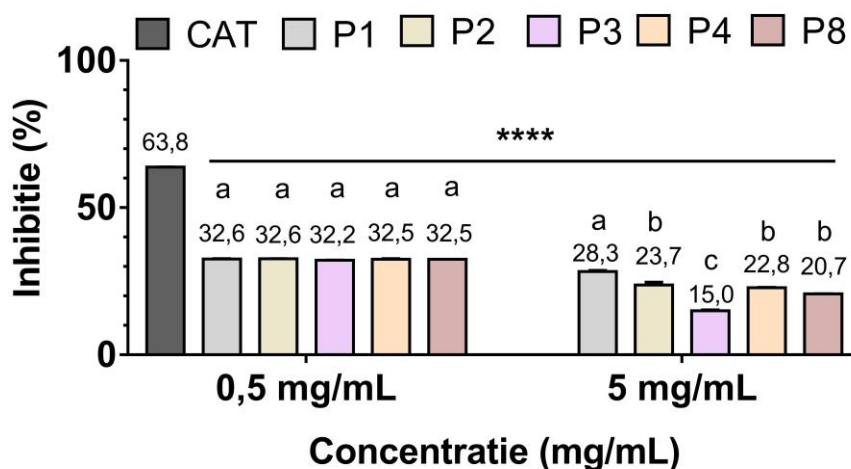
În cazul primei metode, activitatea antioxidantă a fost determinată pentru concentrațiile 10 mg/mL, 5 mg/mL, 3 mg/mL, 1,5 mg/mL, 0,5 mg/mL, respectiv 0,3 mg/mL și a fost monitorizată timp de 20 de minute față de activitatea acidului ascorbic ca standard antioxidant. O probă de propolis (P2;  $IC_{50}^{DPPH} = 0,0700 \pm 0,0132$  mg/mL) s-a remarcat printr-un potențial antioxidant ușor superior vitaminei C.



**Figura 8. Activitatea antioxidantă în funcție de doză, respectiv variația  $IC_{50}^{DPPH}$  pentru eșantioanele de propolis evaluată prin metoda DPPH.**

(Diferențele semnificative dintre probele de propolis sunt ilustrate prin litere distincte;  $p < 0,05$ , Bonferroni. Toate probele, cu excepția probei P2, diferă semnificativ de acid ascorbic;  $p < 0,0001$ , Bonferroni).

Deoarece extractele de propolis în concentrație de 5 mg/mL au prezentat capacitate antiradicalară importantă ( $89,91 \pm 4,08\%$ , DPPH), care s-a menținut la un nivel ridicat la 0,5 mg/mL ( $59,00 \pm 20,97\%$ ), acestea au fost evaluate din punctul de vedere al activității antioxidante printr-o metodă suplimentară, tehnica FOX, fiind utilizată catalaza (CAT) drept standard antioxidant al activității de scavenger pentru  $H_2O_2$  (Fig. 9). Probele P5, P6 și P7 nu au manifestat potențial antioxidant la evaluarea prin metoda FOX.



**Figura 9. Activitatea antioxidantă a eșantioanelor de propolis evaluată prin metoda FOX.**  
(Propolis vs. CAT (catalaza), \*\*\*\* $p < 0,0001$ , Bonferroni).

Toate eșantioanele de propolis din Fig. 9 au avut o activitate antioxidantă comparabilă atunci când au fost aplicate în concentrație de 0,5 mg/mL, activitate estimată la ~50% din cea a catalazei. În mod paradoxal, extractele aplicate în concentrația mare (5 mg/mL) au prezentat o activitate antioxidantă mai redusă față de cele aplicate în concentrația mică (0,5 mg/mL). Acest fapt sugerează posibilitatea existenței unui efect de tip *hormetic*, raportat în literatura de specialitate în mod particular pentru resveratrol.

Deoarece polifenolii sunt compușii cel mai frecvent asociați activității antioxidante a propolisului, a fost investigată existența unei corelații între conținutul în polifenoli totali al extractelor etanolice de propolis și activitatea lor antioxidantă. Nu s-a găsit nicio asociere semnificativă din punct de vedere statistic ( $p < 0,05$ ) între cele două variabile. În ceea ce privește polifenolii individuali, s-au găsit corelații pozitive semnificative ( $p < 0,05$ ) între activitatea antioxidantă a propolisului și conținutul în acid *p*-cumaric ( $r = 0,713$ ); de asemenea, efectul antioxidant s-a corelat pozitiv, semnificativ ( $p < 0,05$ ) cu acidul gras *cis*-palmitoleic ( $r = 0,717$ ) și, respectiv, cu conținutul în zinc ( $r = 0,790$ ), fosfor ( $r = 0,771$ ) și crom ( $r = 0,708$ ).

## IV.2. Evaluarea ACTIVITĂȚII ANTIBACTERIENE a propolisului

În ceea ce privește activitatea antibacteriană a extractelor apoase de propolis, doar probă P3 a prezentat activitate antibacteriană testată prin metoda spectrofotometrică, asupra tulpinilor de *Listeria monocytogenes* (inhibiție de 55,32%), în timp ce pe *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*, inhibiția a fost mai redusă (41,89% și 30,78%). De asemenea, acest extract apos a fost eficient asupra speciei *Salmonella typhimurium* la metoda difuziei în agar.

A fost investigat potențialul antimicrobian al extractelor etanolice de propolis, fiind aleasă tot proba P3 solubilizată în DMSO (dimetilsulfoxid) pentru a fi testată asupra bacteriilor Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) și, respectiv, Gram-negative (*Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Haemophilus influenzae*) – Fig. 10. DMSO a reprezentat controlul negativ, iar gentamicina (10 mcg) – controlul pozitiv.



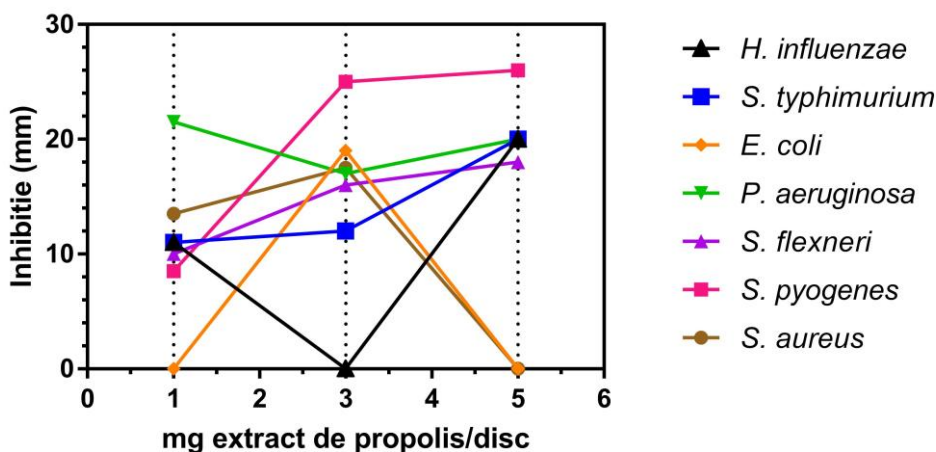


Figura 10. Activitatea antibacteriană dependentă de doză a extractului etanolic P3.

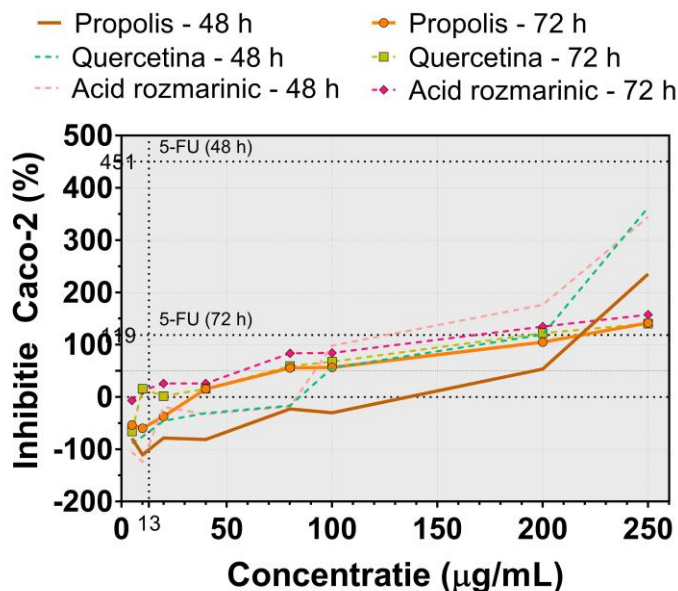
S-a observat o sensibilitate crescută la extractul etanolic de propolis solubilizat în DMSO, dependentă de doză, îndeosebi a tulpinilor: *Streptococcus pyogenes* (inhibiție maximă la doza de 5 mg extract de propolis/disc: 26 mm) comparabilă cu efectul gentamicinei. În ceea ce privește germenii Gram-negativi, un efect antibacterian comparabil a fost obținut în cazul speciilor *Haemophilus influenzae*, *Salmonella typhimurium*, and *Shigella flexneri*. Interesant, pentru tulpinile de *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*, efectul antibacterian a fost decelabil când P3 a fost aplicat în doză de 3 mg dar a fost eliminat la doza maximă testată de 5 mg (Fig. 10). În lucrare sunt prezentate și discutate efectele extractelor de propolis și prin raportare la efectul individual al solventului.

#### IV.3. Evaluarea ACTIVITĂȚII ANTITUMORALE a propolisului la nivelul liniilor celulare de cancer de colon (Caco-2) și melanom malign uman (A375)

Activitatea antiproliferativă a propolisului din vestul României a fost evaluată prin metoda Alamar-Blue în premieră la nivelul a 2 linii celulare maligne umane, comparativ cu efectele concentrațiilor echivalente de quercetină și acid rozmarinic, compuși polifenolici dozați anterior în extractele de propolis. Au fost testate concentrații crescând între 5 și 250  $\mu\text{g/mL}$ , iar evaluarea s-a făcut la 48h și 72h de la aplicare (Fig. 11 și 12).

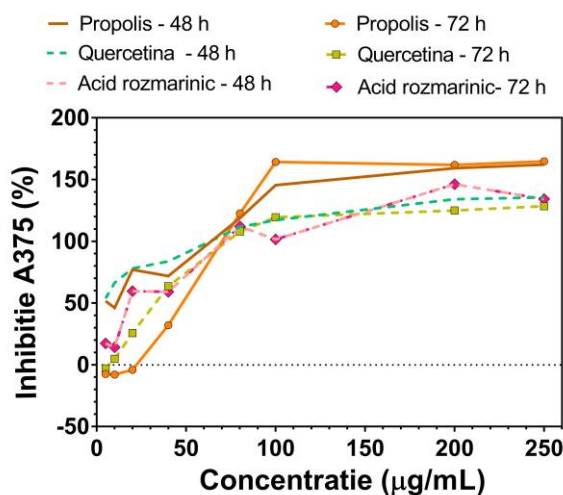
Extractul de propolis (P3) a prezentat acțiune antitumorală asupra ambelor linii celulare testate (melanom malign, cancer de colon), fiind mai eficient asupra celulelor de melanom.

Pentru linia celulară de **cancer de colon Caco-2**, se observă că inhibiția maximă a proliferării celulare este atinsă după 48 ore de tratament, efectul citotoxic reducându-se în timp la 72 ore, pentru toate cele trei extracte aplicate în doză maximă. Efectul citotoxic al extractelor a fost comparat cu cel al unei soluții de citostatic, 5-fluorouracil (5-FU) aplicat în concentrație de 13  $\mu\text{g/mL}$ . Și în cazul 5-FU ca și în cazul extractelor (în doză de 250  $\mu\text{g/mL}$ ), efectul a fost maxim la 48 de ore de tratament (inhibiție procentuală de  $450,51 \pm 109,96\%$ ) și a scăzut la 72 ore (inhibiție de  $118,59 \pm 6,02\%$ ). Efectul antiproliferativ al extractelor a înregistrat o creștere progresivă dependentă de doză la 72 ore de tratament, fiind evident de la 100  $\mu\text{g/mL}$  pentru toți cei 3 compuși; la doza de 200  $\mu\text{g/mL}$  inhibiția a fost comparabilă cu cea indusă de 5-FU. Interesant, la concentrația maximă (250  $\mu\text{g/mL}$ ) extractele au indus o inhibiție ușor superioară (propolis –  $141,95 \pm 9,52\%$ , quercetina –  $140,45 \pm 6,44\%$ , acidul rozmarinic –  $157,42 \pm 17,77\%$ ) celei induse de 5-FU ( $118,59 \pm 6,02\%$ ) (Fig 11).



**Figura 11. Evaluarea efectului antiproliferativ asupra liniei celulare de cancer de colon la 48 și 72h de tratament (5-FU=5-fluorouracil).**

În ceea ce privește linia celulară A375 de melanom malign uman, propolisul a demonstrat o activitate antiproliferativă superioară celei exercitate asupra celulelor Caco-2, efectul fiind prezent de la doze mai mici, după o perioadă scurtă de tratament. Astfel, aplicat în concentrația minimă (5 μg/mL), propolisul a determinat o inhibiție semnificativă de peste 50%, după 48 ore de tratament. După 72 ore, efectul antiproliferativ al propolisului a fost prezent de la doza experimentală de 40 μg/mL (inhibiție de 32,17±5,31%) iar de la 80 μg/mL propolisul a determinat o inhibiție a proliferării celulelor tumorale care a fost superioară celei induse de quercetina și acidul rozmarinic. La doza maximă efectul inhibitor a fost de 164,73±0,75% pentru propolis, 128,52±2,21% - quercetina, respectiv 149,23±3,29% - acid rozmarinic. Se observă că de la concentrația de 100 μg/mL, efectul antiproliferativ al propolisului a fost net superior atât la 48h cât și la 72 ore de tratament; dacă această doză va fi eficientă și pe alte linii celulare maligne și/sau pe modele tumorale *in vivo* rămâne de demonstrat (Fig. 12).



**Figura 12. Evaluarea efectului antiproliferativ asupra liniei celulare de melanom malign la 48 și 72h de tratament.**

## V. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA ULEIULUI VOLATIL ȘI A APEI AROMATICE DE PROPOLIS

Uleiul volatil a fost extras din propolis prin antrenare cu vapori de apă, utilizând un dispozitiv de tip Clevenger. Compoziția chimică a acestuia a fost investigată prin cromatografie gazoasă cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS). Compușii care au predominat în ulei au fost carvona (43,81%) și anetolul (41,20%). *Citronelolul* este un component care a fost identificat *în premieră* în uleiul esențial de propolis.

Apa aromatică de propolis, rezultată în cursul procedurii de obținere a uleiului volatil, a fost caracterizată din punct de vedere chimic și biologic. Polifenolii individuali identificați în apa de propolis prin LC-MS au fost: resveratrol, acid rozmarinic, kaempferol, quercetină și acid *p*-cumaric. Concentrația acestora a fost redusă, variind între 0,44 și 2,54 μg/mL.

În continuare a fost evaluată activitatea antimicrobiană a apei aromatice de propolis prin metoda spectrofotometrică. Aceasta a fost prezentă (dependent de doză) pentru speciile *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Haemophilus influenzae*, și *Streptococcus pyogenes*. Eficacitatea maximă a fost descrisă pentru *Salmonella typhimurium*. Efecul anti-*H. influenzae* a fost superior efectului antimicotic asupra *C. albicans*. Interesant, efectul antibacterian asupra *E.coli* a fost invers proporțional cu doza aplicată, fiind maxim la 25 μL (Fig. 13).

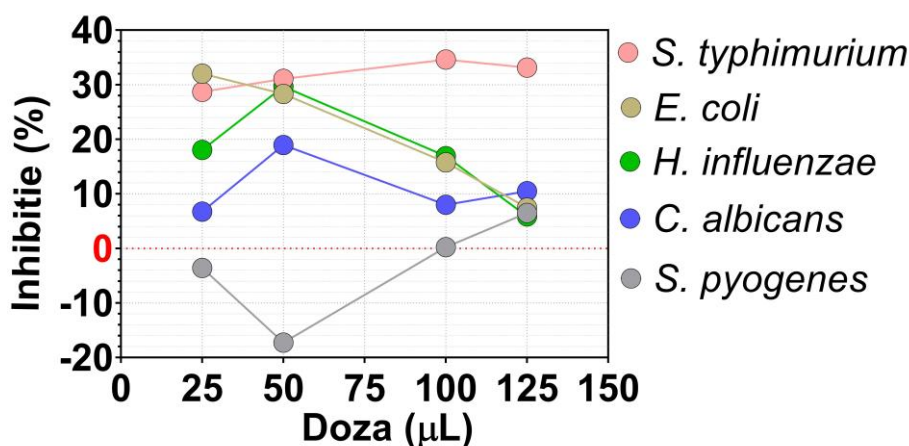


Figura 13. Activitatea antimicrobiană a apei aromatice de propolis.

## VI. FORMULAREA ȘI CARACTERIZAREA UNOR MICROPARTICULE POLIMERICE CU PROPOLIS

Au fost preparate microparticule poliuretanică cu extract etanolic de propolis, care au fost caracterizate sub aspectul comportamentului termic prin calorimetrie cu scanare diferențială și, respectiv, a stabilității fizice prin determinarea potențialului Zeta. În continuare a fost determinată activitatea antibacteriană a microparticulelor poliuretanică cu propolis prin metoda difuziei în agar, asupra următoarelor tulpini bacteriene: *S. pyogenes*, *S. aureus*, *S. flexneri*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. typhimurium* și *H. influenzae*, comparativ cu efectul gentamicinei (10 mcg). Analiza termică a indicat o incluziune eficientă la nivelul particulelor cu dimensiunea de  $572,13 \pm 35,12$  nm; indicele de polidispersie a variat între 0,4 și 0,7, iar potențialul Zeta a fost cuprins între 16,3 și 19,8 mV. Microparticulele poliuretanică cu extract etanolic de propolis nu au prezentat însă activitate antibacteriană pe tulpinile testate, fiind necesare studii suplimentare asupra capacității de eliberare a acestora.

## VII. CONCLUZII

1. Conținutul mediu de lipide din propolis a fost  $33,17 \pm 5,16\%$ , fracțiile lipidice preponderent identificate fiind acizii grași saturați. Din categoria acizilor grași nesaturați au predominat acidul oleic și  $\alpha$ -linolenic (acid gras esențial).
2. Conținutul mediu de proteine totale din propolis a fost de  $1,26 \pm 0,38\%$ . Au fost identificați următorii aminoacizi esențiali: valina, treonina, izoleucina, lizina, fenilalanina și leucina. Dintre toți aminoacizii, au predominat valina și alanina.
3. Conținutul mediu de substanțe minerale totale din propolis a fost de  $0,91 \pm 0,51\%$ . Propolisul s-a remarcat printr-un conținut ridicat de potasiu. În ceea ce privește valoarea nutritivă minerală a propolisului, luând în considerare necesarul zilnic la adult, s-a observat un conținut ridicat de fier, crom, zinc și mangan.
4. Procentul de zaharuri reducătoare din propolis a fost de  $0,4 \pm 0,1\%$  iar valoarea energetică a propolisului a fost stabilită la  $545,01 \pm 27,30$  kcal/100 g.
5. Cantitatea de polifenoli total din extractele etanolice de propolis a fost mult superioară celei din extractele apoase. De asemenea, reziduul sec al extractelor etanolice a fost mult mai mare față de cel corespunzător extractelor apoase, etanolul (60% v/v) fiind un solvent de extracție a polifenolilor din propolis mult mai eficient decât apa.
6. Compușii polifenolici prezenți în toate eșantioanele de propolis din zona de vest a României au fost: kaempferolul, quercetina, acidul rozmarinic și resveratrolul, aceștia regăsindu-se atât în extractele apoase, cât și etanolice.
7. Resveratrolul a fost identificat *în premieră națională în propolisul românesc*.
8. Extractele *etanolic* de propolis au prezentat *activitate antioxidantă foarte bună*, chiar la doze mici: procentul de inhibiție a DPPH-ului a fost de  $85,97 \pm 7,63\%$  pentru concentrația de 1,5 mg/mL și, respectiv, de  $59,00 \pm 22,41\%$  la concentrația de 0,5 mg/mL. Valoarea medie a  $IC_{50}^{DPPH}$  pentru cele opt probe a fost de  $0,40 \pm 0,25$  mg/mL.
9. Extractele de propolis cu activitate antioxidantă demonstrată la testul cu DPPH au fost evaluate suplimentar prin metoda FOX; acestea au prezentat o activitate antioxidantă superioară la o concentrație mai redusă, aspect sugestiv pentru efectul *hormetic* al propolisului, descris în literatura de specialitate și pentru alți fitocompuși.
10. Extractele *etanolic* de propolis s-au remarcat printr-o *activitate antibacteriană* importantă asupra *tulpinilor de Streptococcus pyogenes*, inclusiv la doze mici. Dependent de doză, propolisul a manifestat efect antibacterian pe *Haemophilus influenzae* și *Escherichia coli*. Speciile *Staphylococcus aureus* și *Shigella flexneri* au fost mai puțin sensibile.
11. Extractele *apoase* de propolis au fost eficiente asupra unui număr mai redus de tulpini bacteriene, comparativ cu cele etanolice și s-au remarcat prin *eficiența asupra Salmonellei typhimurium*. Speciile *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus* au fost *sensibile la extractele apoase*.
12. Apa aromatică de propolis a prezentat efect biologic propriu, fiind activă asupra speciilor *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* și *Candida albicans*.
13. Activitatea antitumorală a fost testată *în premieră națională* la nivelul *liniilor celulare de cancer de colon și melanom malign uman* și s-a evidențiat faptul că propolisul a prezentat efecte antitumorale comparabile cu quercetina și acidul rozmarinic, dependent de doza aplicată și respectiv, durata tratamentului.
14. Efectul antiproliferativ pe linia celulară de melanom malign uman a fost superior celui obținut pe linia de cancer de colon.
15. Au fost sintetizate microparticule poliuretane cu extract de propolis, cu diametrul cuprins între 0,504  $\mu$ m și 0,621  $\mu$ m care au fost caracterizate fizico-chimic și testate pentru efectul antibacterian, dar capacitatea de eliberare redusă a principiilor active a condus la o inhibiție bacteriană deficitară.



## VIII. CONTRIBUȚII ORIGINALE

1. *Identificarea în premieră a resveratrolului* în toate extractele, etanolice și apoase, obținute din eșantioanele de propolis din zona de vest a țării.
2. *Evidențierea în premieră națională a efectului antiproliferativ al propolisului din vestul țării la nivelul a două linii celulare maligne umane*, de melanom și, respectiv, cancer de colon.
3. Analiza detaliată a *fracției lipidice* din propolis, cu punerea în evidență a unor compuși chimici care, deși minoritari în compoziție, au potențial biologic activ.
4. Cuantificarea *aportului în substanțe minerale* la nivelul eșantioanelor testate și raportarea la necesarul zilnic din dietă, cu evidențierea prezenței oligoelementelor esențiale de tipul: fier, zinc, mangan și crom.
5. Extracția și caracterizarea uleiului volatil și a apei aromatice de propolis și *identificarea în premieră a citronelolului ca și principiu activ în uleiul volatil de propolis*.
6. *Obținerea unei forme farmaceutice moderne cu extract de propolis* și testarea preliminară a efectului antibacterian al acesteia, în vederea utilizării viitoare în formă optimizată ca adjuvant terapeutic.

## IX. LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

1. ***Identification of Resveratrol as Bioactive Compound of Propolis from Western Romania and Characterization of Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts.*** Alexandra Duca, Adrian Sturza, Elena-Alina Moacă, Monica Negrea, Virgil-Dacian Lalescu, Diana Lungeanu, Cristina-Adriana Dehelean, Mirela-Danina Muntean, Ersilia Alexa. ***Molecules***, 2019; 24(18), 3368, 19 pag; (ISI journal, IF=3.060).
2. ***Assessment of Lipid Profile of Eight Propolis Samples from Western Romania.*** Alexandra Duca, Ersilia Alexa, Cristina Adriana Dehelean, Codruța Șoica, Corina Danciu, Iuliana Popescu, Ileana Cocan, Dacian Lalescu, Danina Mirela Muntean. ***Farmacia***, 2019; 67(1):126-132. ISSN: 0014-8237; (ISI journal, IF=1.507).
3. ***Formulation and Characterization of Polyurethane Microstructures with Propolis Extract.*** Alexandra Duca, Florin Borcan, Danina M. Muntean, Ersilia C. Alexa, Codruța M. Șoica. ***Revista de Materiale Plastice***, 2019; 56(2):321-323. ISSN: 0025-5289; (ISI journal, IF=1.248).

