

OBȚINEREA ȘI DETERMINAREA ACTIVITĂȚII ANTIOXIDANTE A EXTRACTELOR POLIFENOLICE DIN PROPOLIS

Cristina CIOBANU^{1,3}, Diana GURANDA¹, Nicolae CIOBANU^{1,3},
Maria COJOCARU-TOMA^{2,3}, Rodica SOLONARI¹

¹Catedra de tehnologie a medicamentelor,

²Catedra de farmacognozie și botanică farmaceutică,

³Centrul Științifico-Practic din Domeniul Plantelor Medicinale
al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

[https://doi.org/10.52556/2587-3873.2021.2\(89\).01](https://doi.org/10.52556/2587-3873.2021.2(89).01)

Rezumat

Timpul ne-a oferit de-a lungul anilor o serie întreagă de noutăți în domeniul medicinei naturiste care au reușit să-și demonstreze cu adevărat valoarea și să-și păstreze actualitatea. Aplicarea apiterapiei este cunoscută din vremuri străvechi și astăzi interesul pentru această ramură a medicinei neconvenționale este din ce în ce mai larg în întreaga lume. Printre produsele apicole cu o valoare incontestabilă este și propolisul care, în prezent, constituie subiectul multelor utilizări terapeutice bazate pe dovezi. Cercetările în domeniul preparatelor cu propolis s-au extins considerabil și prezintă un interes major sub aspect medical și farmaceutic. Propolisul este un excelent antiinflamator, cicatrizant și epitelizant, hepatoprotector, imuno-biostimulator, tonic al vaselor capilare și regenerator al țesuturilor. Este remarcabil faptul că, datorită complexității și variabilității sale compoziționale, propolisul își păstrează integră capacitatea antimicrobiană, spre deosebire de antibioticele de sinteză, la care bacteriile dezvoltă în timp rezistență, fiind necesară introducerea periodică a preparatelor antibiotice noi. Studiul realizat cu privire la obținerea și analiza extractelor de propolis, prin determinarea totalului polifenolic și a activității antioxidante *in vitro*, prin metoda captării radicalului liber DPPH, reprezintă o importantă premiză privind valorificarea și elaborarea de noi forme farmaceutice cu conținut de propolis pentru multiple utilizări curative și profilactice pe bază de materie primă autohtonă.

Cuvinte-cheie: propolis, extract moale, polifenoli, activitate antioxidantă

Summary

Obtaining and determining antioxidant activity of polyphenolic extracts obtained from propolis

Over the years, time has given us a whole series of novelties in the field of natural medicine, which have managed to truly prove their value and keep up to date. The application of apitherapy has been known since ancient times and today the interest in this branch of natural medicine is growing worldwide. Among bee products, with an indisputable value is also propolis, which is currently widely studied, and as a result is the subject of multiple therapeutic uses based on evidence. Research in the field of propolis preparations has expanded considerably and is of major medical and pharmaceutical interest. Propolis is an excellent anti-inflammatory, healing and epithelializing, hepatoprotective, immuno-biostimulator, capillary tonic and tissue regenerator. It is remarkable that, due to its complexity and compositional variability, propolis retains its full antimicrobial capacity, unlike synthetic antibiotics, which bacteria develop resistance over time, requiring the periodic introduction of new antibiotics. The study on obtaining and analyzing propolis extracts, by determining the total polyphenolic and antioxidant activity, by scavenging method

of the free radical DPPH, is an important premise for the use and development of new pharmaceutical forms containing propolis for multiple curative-prophylactic uses based on local raw materials.

Keywords: propolis, soft extract, polyphenols, antioxidant activity

Резюме

Получение и определение антиоксидантной активности полифенольных экстрактов, полученных из прополиса

За прошедшие годы, время подарило нам целый ряд инноваций в области натуральной медицины, которые действительно доказали свою ценность и идут в ногу со временем. Применение апитерапии известно с давних времен и сегодня интерес к этому разделу народной медицины растет во всем мире. Среди продуктов пчеловодства прополис в настоящее время широко изучается и в результате является предметом многочисленных терапевтических использований, основанных на доказательной медицине. Исследования в области препаратов прополиса значительно расширились и представляют большой медицинский и фармацевтический интерес. Прополис - прекрасное противовоспалительное, заживляющее и эпителизирующее, гепатопротекторное, иммуно-биостимуляторное, капиллярное тонизирующее средство и регенератор тканей. Примечательно, что из-за своей сложности и вариативности состава, прополис сохраняет свои противомикробные свойства, в отличие от синтетических антибиотиков, устойчивость к которым со временем вырабатывается у бактерий, что требует периодического введения новых антибиотиков. Исследование получения и анализа экстрактов прополиса путем определения общей полифенольной и антиоксидантной активности методом улавливания свободных радикалов (DPPH) является важной предпосылкой для использования и разработки новых фармацевтических форм, содержащих прополис, для различных лечебно-профилактических целей на основе местного сырья.

Ключевые слова: прополис, густой экстракт, полифенолы, антиоксидантная активность

Introducere

În prezent, o tendință actuală de dezvoltare a industriei farmaceutice urmărește obținerea antioxidantilor naturali, extrași din materii prime autohtone, de bună calitate. Această promițătoare direcție în sănătatea publică este proiectată special pentru a crește speranța de viață sănătoasă, precum

și pentru prevenirea bolilor cronice. Descoperirea rolului esențial pe care îl deține echilibrul dintre factorii prooxidanți și sistemele antioxidante în viața omului, în special, al celui care trăiește într-un mediu deosebit de complex, expus multor factori de agresiune, a condus la căutarea resurselor naturale capabile să asigure un aport cantitativ și calitativ de compuși cu acțiune antioxidantă. Prin marea afinitate a antioxidantilor față de radicalii liberi, acești compuși constituie ținta preferată a acțiunii oxidative, protejând astfel microstructurile celulare, ADN-ul și alți compuși lipidici și proteici esențiali [10].

În acest context, dezvoltarea societății umane a permis cunoașterea unor resurse naturale remarcabile, datorită proprietăților lor antioxidante, precum sunt produsele albinelor. Cunoscute din antichitate, produsele apicole precum mierea, polenul, lăptișorul de matcă, ceara de albine și veninul au fost folosite de egiptenii și grecii antici în tratamentul și profilaxia afecțiunilor dermatologice, digestive și respiratorii. Propolisul, cu rol esențial în stupul albinelor împotriva agresorilor externi, a fost cel mai pe larg utilizat produs datorită efectelor sale antimicotice, bactericide și bacteriostatice [4]. Studiile și cercetările recente efectuate asupra acestor resurse naturale capabile să asigure organismului uman echilibrul nutrițional și buna funcționare au evidențiat valoarea biostimulentă, nutritivă și terapeutică a acestor valoroase produse.

Propolisul prezintă o substanță rășinoasă aromată colectată de albine din mugurii și axilele frunzelor anumitor copaci (castani, sălcii, mesteceni, ploi ș. a.), folosită pentru căptușirea pereților interiori din stup, lipitul fagurilor de rame și acoperirea dăunătorilor intruși. Propolisul are o compoziție deosebit de complexă, fiind constituită din următoarele grupe de substanțe active: fenoli, flavonoizi, aminoacizi, steroizi, vitamine (A, C, E, PP și componente ale complexului B), enzime, terpene, ulei volatil, glucide și săruri minerale [2, 7]. Propolisul este un excelent antibiotic natural, având diverse proprietăți biologice și farmacologice, ale cărui mecanisme de acțiune au fost investigate pe scară largă în ultimii ani, utilizând metode experimentale *in vitro* și *in vivo* [14]. Printre acțiunile terapeutice se enumeră: antimicrobiană, antibiotică, antifungică, antiinflamatorie, analgezică, antioxidantă și antitumorală [11]. Propolisul, numit „cleiul de albine”, în stare naturală sau sub formă de extracte, obținute prin aplicarea unor procedee blânde, reprezintă o sursă originală de produși cu acțiune complexă. În prezent, pe plan mondial, propolisul este utilizat cu siguranță fundamentată științific, în stare naturală, sub formă de extracte, tincturi și sirop, încapsulat sau tabletat în formulări medicamentoase ca supliment sau aditiv alimentar [8].

În acest context, propolisul s-a dovedit a fi o sursă extrem de valoroasă sub aspectul compoziției sale bogate în compuși cu acțiune antioxidantă, și anume de natură fenolică, astfel reprezentând o provocare pentru știința medicală și cea farmaceutică.

Scopul acestei lucrări a constat în obținerea extractului moale de propolis, determinarea conținutului total de polifenoli cu ajutorul reactivului Folin-Ciocalteu, precum și a activității antioxidante a acestora prin metoda DPPH.

Materiale și metode

Cercetările experimentale au fost efectuate în cadrul subdiviziunilor Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. Ca material apicol luat în studiu a servit propolisul colectat de la coloniile de albine localizate în raionul Nisporeni, Republica Moldova. Toți reagenții chimici folosiți în cercetare au fost de calitate pur pentru analiză.

Metodologia obținerii extractelor moi

Procesul tehnologic de fabricare a extractelor moi din propolis a cuprins următoarele etape: selecția propolisului care la examinarea organoleptică nu prezintă aspect lucios, impurități sau alte semne de degradare; mărunțirea blocurilor de propolis ce permite creșterea suprafeței de contact cu solventul, facilitând extracția; macerarea (extracția principiilor active din propolis a fost realizată cu alcool etilic de 70% în raportul 1:10); filtrarea în scopul separării reziduurilor nedizolvate; concentrarea sub vid la rotavapor (Laborota 4011) la 50°C, până a fost redusă cantitatea de solvent la limita de 20%.

Determinarea conținutului total de polifenoli

Pentru determinarea conținutului total de polifenoli în extracte a fost utilizată metoda Folin-Ciocalteu [6]. Pentru analiză s-a dizolvat propolis în etanol de 96% (1:10), 0,5 ml de soluție cercetată a fost transferată într-un balon cotat de 25 ml, conținând 10 ml de apă distilată, unde s-a adăugat 0,5 ml de reactiv Folin-Ciocalteu. După 5 minute de repaus, au fost adăugate 8 ml de soluție de carbonat de sodiu 7,5% și s-a mixat riguros. Volumul balonului a fost adus până la cotă cu apă distilată. După 2 ore, a fost măsurată absorbanta la spectrofotometru (Metertech UV/SP 8001) la lungimea de undă $\lambda=760$ nm. Conținutul total de polifenoli a fost estimat, folosind curba de etalonare a acidului galic (standard de referință), în limita de concentrare de la 0,1 la 2 mg/ml.

Determinarea activității antioxidante

Capacitatea activității antioxidante a fost determinată prin metoda captării radicalului DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), metodă frecvent utilizată

datorită stabilității, simplității și reproductibilității sale [9, 10]. În prezența antioxidantilor, DPPH (compus de culoare violetă) este redus la un compus galben pal, iar variația absorbanței DPPH a fost măsurată la lungimea de undă 517 nm [3]. Soluțiile stoc (1 mg/ml) s-au diluat până la concentrațiile finale de 200, 100, 75, 50, 25, 10 și 1 $\mu\text{g/ml}$ în alcool etilic de 96%. Soluțiile de concentrații diferite în volum de 1,5 ml s-au adăugat la soluția etanolică de DPPH (3 ml, 20 mg/l). Peste 20 de minute de incubare la loc ferit de lumină și la temperatura camerei, s-a măsurat absorbanta soluțiilor la lungimea de undă 517 nm. Soluția DPPH (3 ml, 20 mg/l) în alcool etilic (1,5 ml) s-a utilizat în calitate de control negativ. Troloxul (1 mg/ml) a servit ca soluție standard.

Rezultate și discuții

Obținerea extractelor moi. Propolisul reprezintă o masă dură la temperatura ambiantă și devine friabilă la temperaturi scăzute, sub 15°C, chiar și pentru sorturile ceroase. La temperaturi ridicate se înmoaie, devenind rășinos și lipicios. Culoarea propolisului depinde de sursa vegetală vizitată de albine: propolisul din zonele cu climă temperată prezintă o gamă de culoare ce variază de la brun de-

schis la brun închis, uneori cu reflexe galben-verzui. În Australia și în zonele cu climat tropical culoarea propolisului poate ajunge până la negru [13]. Mirosul propolisului este foarte specific, complex, balsamic, amintind ceara, mierea și vanilia, acest parametru este variabil în funcție de sursa de cules. Greutatea specifică a propolisului cuprinde valori între 1,033 și 1,145 kg/m^3 . Gustul, de asemenea un parametru specific dependent de sursa vegetală, este în general iute, arzător. Propolisul nu poate fi folosit direct ca materie primă, el trebuie purificat prin extracție cu solvenți. Acest proces îndepărtează materialul inert și păstrează fracția polifenolică.

Materialul de analizat folosit în studiu, propolisul autohton, a fost supus extragerii cu alcool etilic de 70% care, conform datelor din literatura de specialitate, este cel mai eficient extragent, comparativ cu apa sau cu alte concentrații de etanol [12]. Pentru cercetare au fost obținute 3 serii experimentale. Procesul tehnologic de obținere a extractelor moi din propolis a fost realizat conform etapelor prezentate în figura 1.

Extracțele au fost filtrate prin hârtia Whatman nr. 2 sub vid, utilizând pâlnia Buchner. Același procedeu a fost repetat de trei ori (până la epuizare).

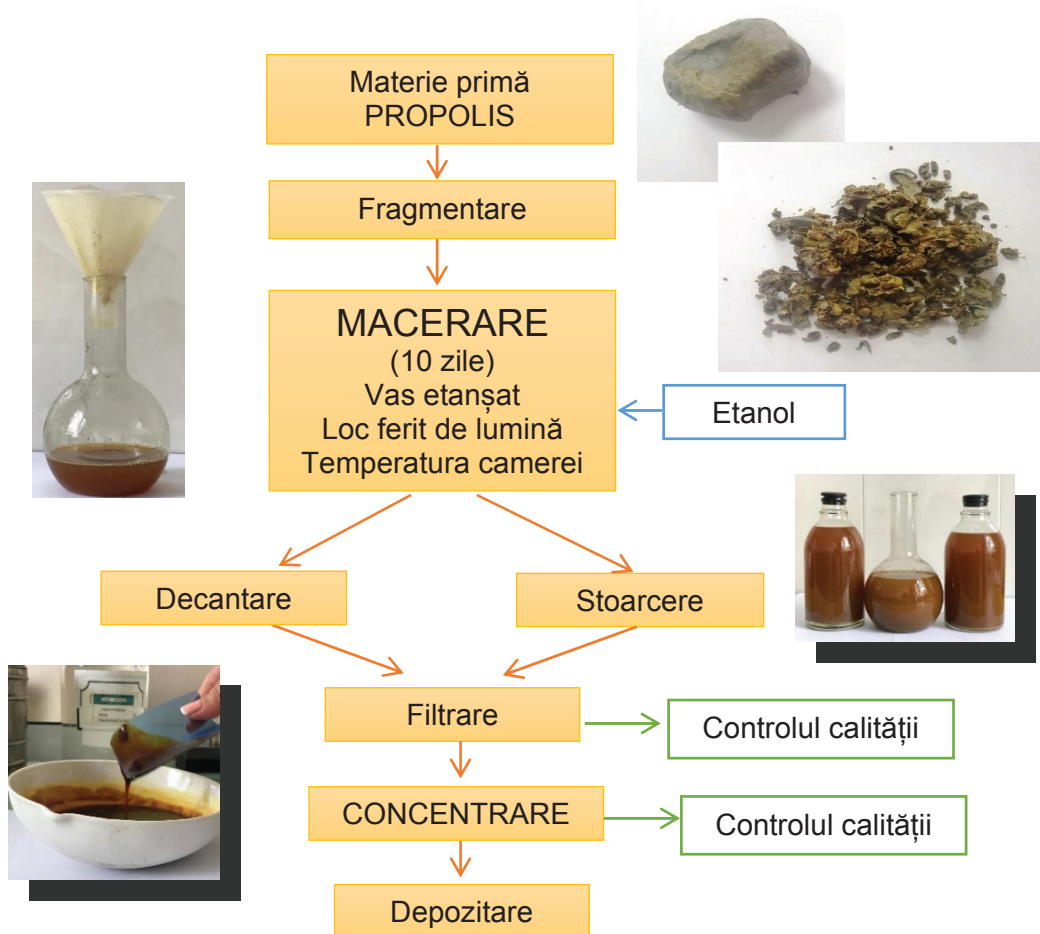


Figura 1. Schema tehnologică de obținere a extractului moale de propolis

Extractele combinate s-au evaporat până la uscat la presiune redusă în evaporator rotativ, la temperatura de 50°C. Seriile de analizat au fost evaluate din punct de vedere al calității prin prisma parametrilor farmacotehnici, al caracterelor organoleptice, umidității și analizei chimice.

Totalul polifenolic prin metoda Folin-Ciocalteu. Metoda are la bază transferul de electroni în mediul alcalin cu reducerea complexului acid fosfomolibdenic/fosfovolframic cu formarea cromogenului care a fost determinat spectrofotometric la lungimea de undă 760 nm. În calitate de standard de referință a fost utilizat acidul galic. Curba de calibrare a acidului galic 1mg/ml este prezentată în figura 2; totalul polifenolic a fost calculat conform ecuației pantei.

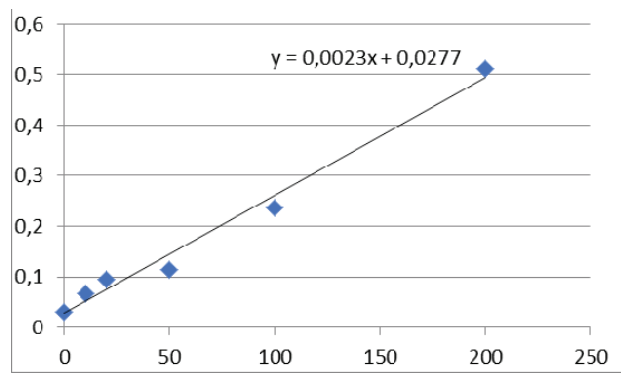


Figura 2. Curba de etalonare a acidului galic

Rezultatele au fost exprimate în mg echivalent acid galic (GAE)/g masa uscată de propolis. Rezultatele obținute ne demonstrează că extractul uscat din propolis este bogat în compuși polifenolici. Totalul fenolic la seriile examinate se încadrează în limitele 249,71 - 253,4 GAE/g masă uscată de propolis fără legătură statistică semnificativă, $p > 0.05$.

Determinarea activității antioxidante prin metoda DPPH. La adăugarea soluțiilor de analizat a reactivului DPPH de culoare violetă, în prezența substanțelor antioxidante, acesta este redus la un compus galben pal, conform imaginii reprezentate în figura 3.

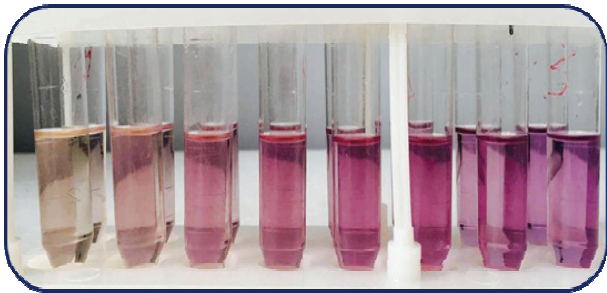


Figura 3. Decolorarea reactivului DPPH în prezența probelor extractive de propolis

Activitatea antioxidantă s-a determinat după formula: $I(\%) = [(Abs_0 - Abs_1)/Abs_0] \times 100$, unde Abs_0 este absorbanța probei martor și Abs_1 este absorbanța probelor testate. În continuare, a fost determinată IC_{50} (concentrația extractului care determină inhibarea a 50% de radicali liberi) pentru fiecare probă și exprimată în mcg/ml. Activitatea antioxidantă a fost reprezentată grafic în funcție de concentrație și valoarea IC_{50} , calculată de pe pantă prin analiza regresiei liniare. Rezultatele obținute demonstrează o dependență liniară între concentrația extractului de propolis și decolorare ($r < 1$). Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

Totalul polifenolic și activitatea antioxidantă determinată prin metoda DPPH.

Extractul moale de propolis	Total Polifenoli* (mg GAE/g)	IC_{50} , μ g/ml*	R^2
Seria 1	249,71 $\pm$ 2,37	55,94 $\pm$ 0,38	0,997
Seria 2	254,15 $\pm$ 1,43	53,75 $\pm$ 0,79	0,999
Seria 3	253,4 $\pm$ 0,84	54,17 $\pm$ 1,24	0,998
Standard Trolox		5,28	0,999

Nota: * este indicată valoarea medie și abaterea standard în urma a cinci măsurări

Activitatea antioxidantă prin testul DPPH denotă faptul că extractul din propolis are acțiune antioxidantă bine pronunțată care corelează proporțional cu totalul fenolic.

Datele literaturii de specialitate, cercetările efectuate în Australia, Brazilia, China, Coreea de Sud și în țările Uniunii Europene, cu scopul determinării proprietăților antioxidante ale propolisului local, au reliefat faptul că efectul redox este proporțional cu conținutul de compuși polifenolici [1, 5, 15, 16]. În figura 4 este reprezentat comparativ potențialul redox al extractelor de propolis, în urma studiilor realizate în diferite țări, prin metodologie asemănătoare. Se observă că propolisul cultivat în Coreea de Sud are cea mai înaltă activitate antioxidantă, $IC_{50} = 43,4$ mcg/ml.

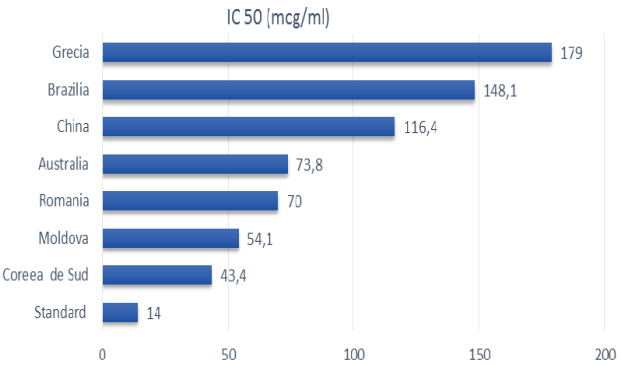


Figura 4. Activitatea antioxidantă (IC_{50}) a propolisului în funcție de zona geografică

Aplicarea tehnologiei de extracție, macerare și concentrare a principiilor de natură fenolică din

propolisul obținut în condițiile țării noastre a rezultat în amplificarea activității antioxidante a extractului de propolis, fiind mai mare comparativ cu extractele studiate în România, Brazilia, China și în alte țări, valoarea IC₅₀ (53,75-55,94 mcg/ml) fiind invers proporțională capacității de captare a radicalilor liberi. Astfel, propolisul colectat în Republica Moldova prezintă o sursă de medicamente și suplimente alimentare foarte competitive pe plan internațional.

Concluzii

Propolisul a devenit, în ultimele decenii, un obiect de cercetare promițător, fiind utilizat pe scară largă în medicina tradițională. Optimizarea extracției compușilor polifenolici cu amestec hidro-alcoolic asigură un grad sporit de extracție a substanțelor active și conferă, de asemenea, o stabilitate înaltă. Extractul obținut din propolis prezintă un produs cu conținut ridicat de principii active de natură fenolică și manifestă acțiune antioxidantă bine pronunțată care corelează proporțional cu totalul fenolic.

Determinarea activității antioxidante a extractului de propolis autohton a demonstrat potențial pentru valorificare, în comparație cu alte țări. Astfel, procesarea extractelor obținute de propolis în formulări farmaceutice va crește în mod semnificativ proprietățile antioxidante cu impact benefic asupra organismului uman.

Bibliografie

- Ahn M., Kumazawa S., Usui Y. et al. *Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China*, Food Chem., 2007, 101:1383–92. Disponibil pe: doi: 10.1016/j.foodchem.2006.03.045.
- Bankova V. *Chemical diversity of propolis and the problem of standardization*, Journal of Ethnopharmacology. 2005, vol. 100, p.114–117.
- Brand-Williams W. *Use of a free radical Method to evaluate Antioxidant activity*, In: LWT – Food Science and Technology. 1995, vol. 28, no 1, p. 35-30.
- Castaldo S., Capasso F. *Propolis, an old remedy used in modern medicine*. Fitoterapia. 2002, 73 (Suppl. S1), S1–S6.
- Dărăban A., Olah N., Burtescu R., Pripon F., Hanganu D. et al. *The evaluation of antioxidant capacity of propolis originating from western Romania*. In: Farmacia, 2019, Vol. 67, p. 111-116. Disponibil pe: doi: 10.31925/farmacia.2019.1.15.
- European Pharmacopeia, Strasbourg, vol.1, 2014, p. 806.
- Kurek-Gorecka A., Rzepecka-Stojko A., Gorecki M. et al. *Structure and Antioxidant activity of polyphenols derived from propolis*, Molecules. 2014, vol.19, p.78-101. Disponibil pe: doi:10.3390/molecules19010078, ISSN 1420-3049.
- Laura C., Marco B., Jianbo X. et al. *Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products*, frontiers in Pharmacology. 2017. Disponibil pe: doi:10.3389/fphar.2017.00412.
- Magalhaes L., Segundo M., Reis S. et al. *Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties*, 2008, Analytica Chimica Acta, vol. 613, p.1-194, ISSN:0003-2670.
- Milardovic S., Ivekovic D., Grabaric B., et al. *Use of DPPH/DPPH redox couple for biampereometric determination of antioxidant activity*. 2005, Electroanalysis, vol.17, p.1847-1853, ISSN:1521-4109.
- Noushin A., Alireza N. *Propolis diterpenes as a remarkable bio-source for drug discovery development: A Review*. In: Int. J. Mol. Sci. 2017, 18, 1290. Disponibil pe: doi:10.3390/ijms18061290.
- Ramanauskienė K., Inkenienė A., Petrikaite V., Briedis V. *Total phenolic content and antimicrobial activity of different Lithuanian propolis solutions*. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2013(2):842985.
- Ristivojevic P., Trifkovic J., Andrić F., Milojković-Opsenica D. *Poplar-type propolis: chemical composition, botanical origin and biological activity*. Natural Product Communications, 2015, Nr. 10 (11). pp. 1869-1876. Disponibil pe: doi: 10.1177/1934578X1501001117.
- Shuai H., Cui-Ping Z., Kai W., et al. *Recent advances in the chemical composition of propolis*, Molecules, 2014, 19, 19610-19632. Disponibil pe: doi:10.3390/molecules191219610, ISSN 1420-3049.
- Vasiliki L., Prasianaki D., Krysta F. *Antioxidant properties and phenolic composition of Greek propolis extracts*, International Journal of Food Properties, 2014, 17:3, 511-522. Disponibil pe: doi: 10.1080/10942912.2012.654561.
- Xue W., Karuppasamy S., Yizhe C. et al. *Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea*, BMC Complementary and Alternative Medicine BMC series – open, inclusive and trusted, 2016.

Ciobanu Cristina, dr. șt. farm.,
conferențiar universitar,
Catedra de tehnologie a medicamentelor,
Centrul Științifico-Practic din Domeniul
Plantelor Medicinale,
USMF „Nicolae Testemițanu”,
tel.: +373 22 205 488, +373 692 52 858;
e-mail: cristina.ciobanu@usmf.md