

REZUMAT

CARACTERIZAREA POLENULUI RECOLTAT DE ALBINE ÎN VEDEREA OBTINERII DE SUPLIMENTE ALIMENTARE

Conducător științific: Prof.univ.dr. POPA Ovidiu

Doctorand: MARIA I. Antoaneta-Roxana (SPULBER)

Cuvinte cheie: polen recoltat de albine, origine botanică, compoziție chimică, compuși biologic activi, nanoparticule magnetice.

Teza de doctorat intitulată ”*Caracterizarea polenului recoltat de albine în vederea obținerii de suplimente alimentare*”, analizează diferite sorturi de polen sub aspect structural, fizico-chimic și biologic. Totodată este evidențiat potențialul nutrițional și capacitatea polenului de a forma api-nanosisteme cu caracteristici biologice îmbunătățite.

Teza a fost structurată în două părți principale, anume: partea I, *Studiu bibliografic* și partea II, *Cercetări proprii*, urmate de prezentarea bibliografiei și lista de lucrări publicate pe parcursul elaborării tezei de doctorat.

Partea de **studiu bibliografic** este redactată în 2 capitole, ce numără un total de 37 pagini, cu o pondere de 21% din volumul tezei.

Capitolul I (Caracterizare morfologică și fizico-chimică a polenului recoltat de albine) vizează caracteristicile morfologice ale polenului, evidențiază o serie de aspecte macroscopice, microscopice și de microstructură și prezintă compoziția chimică a polenului recoltat de albine, tratând individual principalele clase de compuși chimici identificați în polen.

Capitolul II (Metode de extracție utilizate pentru separarea și identificarea compușilor biologic activi cu valoare nutritivă și apiterapeutică) este dedicat metodelor și condițiilor de extracție folosite pentru separarea unor compuși de interes nutrițional, dar și subliniază valoarea nutritivă și apiterapeutică a polenului.

Partea a II-a include *Cercetări proprii* prezentate în 143 pagini, reprezentând 79% din prezenta lucrare, fiind structurată la rândul ei în 5 capitole care descriu scopul și obiectivele cercetărilor, materialul vegetal utilizat, cadrul natural geografic și instituțional în care s-au derulat cercetările, rezultatele experimentale obținute și interpretarea lor, concluzii generale și recomandări.

Cercetările efectuate au urmărit stabilirea caracteristicilor specifice fiecărui sortiment de polen, evaluarea activității biologice, obținerea și caracterizarea unor compuși nanostructurați cu potențial biomedical.

Pentru atingerea scopului propus au fost propuse și realizate următoarele obiective:

- ✓ Caracterizarea morfologică la nivel macroscopic și microscopic a tipurilor de polen.
- ✓ Caracterizarea sorturilor de polen prin identificarea și cuantificarea principalilor compuși chimici în urma aplicării metodelor analitice
- ✓ Elaborarea și aplicarea unei metode chemometrice pentru diferențierea sorturilor de polen.
- ✓ Evaluarea principalelor activități biologice a probelor de polen in vitro
- ✓ Utilizarea extractelor de polen în obținerea unor compuși nanostructurați
- ✓ Caracterizarea api-nanocomplexului format și evaluarea potențialului biomedical al complexului nanostructurat.

Fiecare capitol al părții a II-a cuprinde o scurtă introducere, descrierea materialelor și metodelor utilizate, rezultate și discuții și se încheie cu o secțiune destinată concluziilor desprinse din capitolul respectiv.

În **capitolul III** sunt redate etapele formării eşantioanelor de polen utilizate pentru caracterizarea macroscopică, senzorială și identificarea originii botanice a polenului.

În **capitolul IV** sunt descrise în detaliu etapele caracterizării fizico-chimice a probelor de polen recoltat de albine, reprezentând cel mai voluminos capitol experimental. Au fost determinați următorii parametri: umiditatea prin metoda termogravimetrică, conținutul de proteine totale, profilul aminoacizilor liberi prin tehnica cromatografiei lichide cuplate cu detector de masă, substanțele minerale atât prin calcinare cât și prin spectrometrie de emisie optică cu plasmă cuplată inductiv (ICP-OES), zahăr total, aciditate liberă, lipide totale, acizii grași prin cromatografie de gaze, conținutul de flavone și flavonoli, conținutul total de polifenoli, profilul compușilor fenolici prin tehnica electroforezei capilare, și aplicarea spectroscopiei FTIR ATR. Spectrele IR achiziționate au constituit baza de date pentru diferențierea și clasificarea probelor de polen recoltat de albine prin metode de statistică multidimensională: Analiza Componentei Principale (APC), Analiza Discriminantă Liniară (ADL) și metoda regresiei tip PLS. Datele statistice au fost prelucrate cu ajutorul programului Matlab (Mathworks, Massachusetts USA versiunea R2015). APC și ADL au fost utilizate pentru clasificarea polenului în funcție de originea botanică și/sau geografică, în timp ce tehnica PLS a fost aplicată pentru identificarea posibilelor corelații între spectrele IR și principalele caracteristici fizico-chimice ale polenului.

Spectrele FTIR- ATR a 47 probe polen au fost supuse analizei chemometrice dând posibilitatea grupării probelor de polen după originea botanică. Strategia experimentală aplicată de noi a combinat analiza spectrală FTIR-ATR și cele mai performante metode analitice, unele dintre acestea constituind o premieră la nivel național privind determinarea pe această matrice de lucru. Tot în cadrul acestui capitol s-au descris condițiile pedo-climatice din toate zonele de amplasament ale stupinelor în care s-au redat cantitățile medii de precipitații și temperaturile lunare înregistrate în perioada desfășurării studiilor.

În **capitolul V** s-au prezentat rezultatele evaluării principalelor activități biologice ale polenului recoltat de albine. S-a avut în vedere determinarea activității antioxidante cu ajutorul radicalilor DPPH și ABTS și a activității antimicrobiene asupra unor tulpini de interes clinic dar și a unor tulpini microbiene patogene pentru unele specii vegetale.

Capitolul VI prezintă utilizarea extractului de polen în obținerea unor compuși nanostructurați anorgano-organici, caracterizarea acestora și demonstrarea stabilității nanofluidului. Metodele de investigare a sistemelor nanostructurate au fost reprezentate de împrăștierea dinamică a luminii, măsurători de potențial zeta și metode de microscopie electronică. Tot în acest capitol este evaluată combinația sinergică a extractelor de polen cu nanoparticulele magnetice de Fe₃O₄-PABA cu scopul identificării unui nano-complex hibrid cu proprietăți antibacteriene superioare.

Capitolul VII finalizează teza cu secțiunea de concluzii generale ce se desprind în urma caracterizării structurale, chimice și de utilizare a polenului.

Rezultate obținute

Capitolul III - Caracterizarea polenului după aspecte morfologice și senzoriale

Fiecare eșantion de polen monocrom caracterizat macroscopic a fost clasificat conform analizei palinologice ca probă monofloră (specie botanică predominantă în procent > 90%), fiind identificate 50% din probele analizate, biflorală (prezența a două specii botanice)- 30% din probe, sau heteroflorală (identificarea în eșantionul de polen a trei sau mai multor specii florale)- 20% din probele incluse în studiu.

Determinarea originii botanice a tuturor eșantioanelor formate și efectuată prin analiză microscopică au identificat 20 specii de plante aparținând a 14 familii botanice, după cum urmează: *Brassicaceae* (*Brassica sp.*), *Asteraceae* (*Carduus sp.*, *Cirsium sp.*, *Helianthus annuus*, *Solidago virgaurea*, *Matricaria sp.* și *Taraxacum officinale*), *Fagaceae* (*Aesculus sp.*), *Plantaginaceae* (*Plantago lanceolata*), *Malvaceae* (*Tilia sp.*), *Rosaceae* (*Prunus L sp.* și *Crataegus monogyna*), *Poaceae* (*Zea mays*), *Caprifoliaceae* (*Symphoricarpos rivularis*), *Vitaceae* (*Vitis sp.*), *Fabaceae* (*Trifolium repens*), *Papaveraceae* (*Papaver sp.*), *Umbeliferae* (*Apiaceae type*), *Lamiaceae* (*Lavandula sp.*), *Anacardiaceae* (*Anacardium sp.*).

Analiza morfologică a tipurilor de polen analizate a identificat limitele situate la cei doi poli a dimensiunilor microscopice la care axa polară a înregistrat valori de 98,2μm, respectiv 24,8μm, iar diametrul ecuatorial 97,9μm, respectiv 25,4μm; aceste valori întâlnindu-se la probele de polen provenite de la *Zea mays* (valoarea maximă) și *Brassica sp.* (valoarea minimă).

Dintre toți parametrii morfologici investigați sub microscopul optic, sculptura exinei prezintă cele mai multe diferențieri în cadrul tipurilor de polen studiate. Trei dintre acestea prezintă structura exinei de tip echinată, toate acestea aparținând familiei *Asteraceae*. Sculptură striată, respectiv striat-perforată s-a evidențiat în cazul reprezentanților familiei *Rosaceae* (*Crataegus*

monogyna și *Prunus sp.*), iar sculptura scabrată s-a întâlnit la polenul speciilor *Plantago lanceolata* și *Papaver sp.* Structura foveolată și reticulată a exinei a fost identificată la câte un tip de polen analizat: *Tilia sp.*, respectiv *Brassica sp.*

Capitolul IV - Caracterizarea fizico-chimică a probelor de polen monoflor

Rezultatele obținute în urma determinării conținutului de apă pentru eșantioanele de polen demonstrează că acest parametru este dependent de unii indicatori meteorologici din perioada de recoltare a polenului, precum temperatura și precipitațiile. Valorile cele mai mari în conținutul total de proteină au fost înregistrate de specii florale ale familiei *Rosaceae* (*Prunus sp.* și *Crataegus monogyna*), iar din analiza generală a datelor, s-a observat că polenurile la care s-a obținut o valoare mai mare de 20% proteină brută provin în special de la speciile vegetale cu înflorire în perioada de primăvară. În compoziția tuturor probelor de polen recoltat de albine au fost identificați 8 amino acizi esențiali (isoleucina, leucina, lizina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofanul și valina) și 14 neesențiali (histidină, arginină, acid aspartic, alanină, acid glutamic, glutamine, glicina, prolina, serina, tirozina, ornitina, asparagine, 4-hidroxi prolina, sarcosina). Polenul speciei *Helianthus annuus* a indicat cea mai crescută valoare pentru concentrația în aminoacizi esențiali, înregistrând 27,5%, iar peste 90 procente au indicat fiecare din sorturile de polen *Crataegus monogyna* și *Prunus sp.* pentru aminoacizii neesențiali, raportat la totalul aminoacizilor determinați.

Toate probele de polen studiate în prezenta lucrare au înregistrat cele mai mari valori pentru concentrația potasiului, conținutul în elemente minerale putând fi aranjat în următoarea serie: K>Ca>Mg>Fe>Zn>Mn>Cu>B.

Și în cazul acizilor grași putem vorbi de specificitate în rândul sorturilor de polen, fiind observată absența unor acizi grași din diferite eșantioane în procente variate: acidul lauric lipsește în aproximativ 60% din probe, acidul margaric în peste 50% din probe, acidul lignoceric lipsește în peste 44% din probe, în timp ce acizii miristic și behenic nu s-au identificat în peste 20%, respectiv 10% din probele analizate. Din punct de vedere al clasificării conținutului de flavone și flavonoli după familia botanică, s-a constatat un conținut mai mare al acestor compuși la speciile aparținând familiei *Asteraceae*, urmată de reprezentanții familiei *Rosaceae*; polenul provenit de la speciile *Taraxacum officinalis* și *Helianthus annuus* au indicat valori crescute ale conținutului de flavone și flavonoli, cât și a conținutului total de polifenoli, ceea ce indică un conținut important de compuși biologic activi în probele de polen;

Rezultatele privind screening-ul compușilor fenolici au indicat faptul că 35% dintre compușii analizați au fost identificați ca unici componenți ai profilului fenolic, putând contribui la conturarea unor markeri biologici în cadrul tipurilor de polen.

Pentru diferențierea botanică și geografică, s-a utilizat întregul domeniu spectral accesibil prin FTIR-ATR (4000-400 cm^{-1}). Datele obținute au fost folosite pentru identificarea unui set de opt proprietăți caracteristice prin aplicarea tehnicilor PCA-LDA-PLS. După prelucrarea primelor zece componente principale (ce au reprezentat 99,8% din variabilitatea experimentală) au fost separate net opt grupuri în spațiul LDA1-LDA2. Rezultatele obținute recomandă metoda spectrometriei FTIR-ATR ca o metodă rapidă pentru identificarea sursei botanice în cazul eșantioanelor de polen de proveniență necunoscută și de asemenea pentru estimarea principalelor proprietăți fizico-chimice.

Capitolul V - Principalele activități biologice ale polenului recoltat de albine

Speciile *Prunus sp.* și *Brassica sp.* au înregistrat cea mai bună activitate antioxidantă exprimată atât prin capacitatea de scavenger a radicalului ABTS, cât și în cazul utilizării metodei DPPH, alături de *Papaver sp.* și *Crataegus monogyna*.

A fost testată activitatea antimicrobiană a extractelor etanolice obținute din polen monoflor față de bacterii Gram pozitive, Gram negative și fungi (atât tulpini de interes medical cât microorganisme patogene pentru unele specii vegetale)

Cele mai sensibile tulpini dintre cele de interes clinic, s-au dovedit bacteriile Gram pozitive și fungii;

Studiul realizat a demonstrat eficacitatea tuturor extractelor etanolice de polen testate ca inhibitori ai tulpinii *Xanthomonas campestris* ICCF 274. Extractul de polen *Zea mays* a manifestat o activitate inhibitorie mai slabă asupra tulpinii *Erwinia carotovora* ICCF 138 comparativ cu celelalte probe testate. Extractele de polen nu au avut efect antifungic asupra tulpinii *Aspergillus niger* ICCF 92.

Capitolul VI - Utilizarea extractului de polen în obținerea unor compuși nanostructurați anorgano-organici

Au fost obținuți compuși nanostructurați hibridi anorgano-organici prin depunerea compușilor naturali ai extractului de polen pe suportul complex de Fe_3O_4 – PABA. Studiile de caracterizare au confirmat prezența structurilor nano și au indicat în unele cazuri parametrii care stabilesc un minimum de predispoziție de agregare.

Confirmarea dimensiunilor nanostructurilor sintetizate s-a realizat prin microscopie electronică, iar stabilitatea acestora prin intermediul potențialului Zeta. Nanostructurile hibride asupra cărora s-a aplicat grefarea cu api-compuși din extractul de polen au confirmat de asemenea atașarea acestora prin creșterea diametrului api-nanosistemelor obținute.

Api-nanosistemul pe bază de polen recoltat de albine a demonstrat inhibarea dezvoltării microorganismelor Gram-pozitive cât și Gram-negative. Dintre bacteriile Gram-pozitive, tulpina *S.*

aureus s-a dovedit cea mai sensibilă la acțiunea api-nanosistemelor funcționalizate cu următoarele extracte de polen: *Brassica sp.*, *Taraxacum officinallis*, *Plantago lanceolata* și *Zea mays*, în timp ce același extract de polen *Brassica sp.* aplicat nanoparticulelor magnetice a exercitat cel mai bun efect inhibitor asupra tulpinii Gram negative, *E. coli*. Activitatea antifungică a complexului hibrid nanostructurat a demonstrat inhibarea cu rezultate bune a 50% din tulpinile testate, iar dintre acestea, *C. albicans* s-a dovedit mai sensibilă la acțiunea api-nanosistemului pe bază de extracte de polen și PABA.

Elemente de originalitate

- caracterizarea microscopica si fizico-chimica a unor varietati (sorturi) de polen provenite din plante autohtone in conditiile climatice ale anilor 2014-2015;
- elaborarea si verificarea unei metode chemometrice pentru identificarea sursei botanice a polenului si evaluarea caracteristicilor fizico-chimice ale polenului recoltat de albine;
- evaluarea activitatii biologice in vitro (activitatea antimicrobiană) a extractelor de polen asupra unor tulpini patogene pentru unele specii vegetale;
- obținerea unor compuși nanostructurați hibridi anorgano-organici prin depunerea compușilor naturali ai extractului de polen pe suportul complex de Fe_3O_4 – PABA;
- testarea activitatii antimicrobiene a api-nanosistemului pe bază de polen