

UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA  
**ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE AGRICOLE INGINEREȘTI**

CLUJ-NAPOCA, 2018





---

TEZA DE DOCTORAT

# Evaluarea potențialului bioactiv al păsturii

---

Doctorand **Adriana Cristina Urcan**

---

Conducător de doctorat **Prof. univ. dr. ing. Liviu  
Alexandru Mărghițaș**

---





---

PhD THESIS

# Assessment of the bioactive potential of bee bread

---

PhD Student **Adriana Cristina Urcan**

---

Scientific coordinator **Prof. univ. dr. ing. Liviu Alexandru Mărghițaș**

---





## LISTA DE PUBLICAȚII

### Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. Otilia BOBIȘ, Daniel DEZMIREAN, Liviu Mărghitaș, Victorița BONTA, **Adriana URCAN**, Claudia PAȘCA, Adela Moise, 2018, *Morus spp.* for revigorating silkworm breeding in Romania and promoting health benefits of leaves and fruits, *Scientific PPERS. Series B. Horticulture*, ISSN 2285-5653; **ISI fără factor de impact**;
2. **Adriana URCAN**, Adriana CRISTE\*, Daniel DEZMIREAN, Otilia BOBIȘ, Liviu MĂRGHITAȘ, Rodica MĂRGĂOAN, Alexandra HRINCA, 2018, Antimicrobial Activity Of Beebread Extracts Against Different Bacterial Strains, *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies*, 75 (2);
3. Daniel Severus DEZMIREAN, Liviu Alexandru MARGHITAȘ, Otilia BOBIȘ, **Adriana Cristina URCAN**, Horatiu DEZMIREAN, Claudia PAȘCA, Adela Ramona MOISE, 2018, Multidirectional Activities for Gene Pool Conservation in GCEARS-PSP, *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies* 75(1);
4. Otilia BOBIȘ, Ioan ZAGRAI, Victorița BONTA, Luminița ZAGRAI, Liviu AL. MĂRGHITAȘ, Daniel S. DEZMIREAN, Claudia PAȘCA, **Adriana URCAN\***, 2017, Comparative studies on chemical composition of two conventional bred and one genetically engineered plum-fruits, *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies*, 74(2)/2017 – **autor corespondent**;
5. **Adriana URCAN**, Liviu AL. MĂRGHITAȘ, Daniel S. DEZMIREAN, Otilia BOBIȘ, Victorița BONTA, Carmen I. MUREȘAN, Rodica MĂRGĂOAN, 2017, Chemical composition and biological activities of beebread – Review, *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies*, 74, 6-14;
6. Otilia BOBIȘ, Daniel DEZMIREAN, Liviu AL. MĂRGHITAȘ, Victorița BONTA, Rodica MĂRGĂOAN, Claudia PAȘCA, **Adriana URCAN** and Pushpendra SINGH BANDHARI, 2017, Beebread from *Apis mellifera* and *Apis dorsata*. Comparative Chemical Composition and Bioactivity, *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies*, 74, 43-50;
7. Rodica MĂRGĂOAN, Liviu AL. MĂRGHITAȘ, Daniel S. DEZMIREAN\*, Otilia BOBIȘ, Victorița BONTA, Corina CĂTANĂ, **Adriana URCAN**, Carmen I. MUREȘAN, Mirela

G. MARGIN, 2017, Comparative Study on Quality Parameters of Royal Jelly, Apilarnil and Queen Bee Larvae Triturate, *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies*, 74, 51-58;

### **Articole submitte spre publicare**

1. Adriana Urcan Adriana Criste Daniel Dezmirean, Rodica Mărgăoan, André Caeiro, Maria Graça Campos, 201x, Achievement bee bread *taxa* source by HPLC/DAD phenolic and polyphenolic fingerprint, *Molecules*



# Cuprins

INTRODUCERE .....	17
PARTEA ÎNTÂI.....	19
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	19
1.PĂSTURA – GENERALITĂȚI.....	21
1.2 Compoziția chimică a păsturii.....	23
1.2.1 Conținutul de apă .....	24
1.2.2 Conținutul de cenușă.....	25
1.2.3 Proteine și aminoacizi.....	25
1.2.4 Lipide și acizi grași .....	26
1.2.5 Glucidele libere.....	27
2. Păștura -importantă sursă de compuși biologic activi.....	28
2.1 Compușii fenolici din păstură .....	28
2.2 Absorbția în UV a compușilor fenolici .....	31
2.3 Capacitatea antioxidantă a păsturii.....	34
2.4 Activitate antimicrobiană .....	36
PARTEA A DOUA .....	23
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ .....	23
SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI .....	39
3. Material și metodică experimentală .....	40
3.1 MATERIALUL BIOLÓGIC UTILIZAT .....	40
3.2 METODE EXPERIMENTALE .....	41
3.2.1 Determinarea originii botanice a probelor studiate – analiza palinologică .....	41
3.2.2 Analize fizico-chimice pentru determinarea valorii nutritive.....	42
3.2.2.1 Determinarea umidității .....	42
3.2.2.2 Determinarea cenușii .....	42
3.2.2.3 Determinarea conținutului de azot total.....	43
3.2.2.4 Determinarea conținutului de lipide totale .....	43
3.2.2.5 Determinarea conținutului de glucide libere.....	44
3.2.2.6 Determinarea valorii nutritive.....	45
3.2.2.7 Determinarea pH-ului și a acidității libere .....	45
3.2.3 Metode de determinare a compușilor biologic activi .....	45
3.2.3.1 Determinarea conținutului de aminoacizi liberi .....	45
3.2.3.2 Determinarea acizilor grași.....	46
3.2.3.3 Prepararea extractelor în vederea analizelor spectrofotometrice .....	47

3.2.3.4 Determinarea conținutului de polifenoli totali .....	47
3.2.3.5 Determinarea conținutului de flavonoide totale.....	47
3.2.3.6 Pregătirea extractelor în vederea analizei HPLC/DAD .....	48
3.2.3.7 Analiza HPLC- DAD a flavonoidelor și a acizilor fenolici.....	48
3.2.4 Metode de determinare a activității antioxidante .....	49
3.2.4.1 Determinarea capacității de captare a radicalului liber DPPH .....	49
3.2.4.2 Determinarea activității antioxidante prin metoda TEAC.....	50
3.2.4.2 Determinarea potențialului antioxidant prin metoda FRAP .....	50
3.2.5 Determinarea activității antimicrobiene .....	51
3.2.5.1 Prepararea extractelor în vederea determinării activității antimicrobiene.....	51
3.2.5.2 Tulpinile bacteriene utilizate și cultivarea lor .....	51
3.2.5.3 Testarea activității antimicrobiene și identificarea concentrației minime inhibitorii.....	52
3.2.6 Protocolul pentru obținerea unui produs tip păstură artificială .....	52
3.3 Interpretarea statistică a rezultatelor.....	53
REZULTATE ȘI DISCUȚII .....	54
4. REZULTATE ȘI DISCUȚII PRIVIND PROBELE DE PĂSTURĂ.....	54
4.1 Rezultate și discuții privind analiza palinologică.....	54
4.2 Rezultate și discuții privind determinarea valorii nutritive .....	61
4.2.1 Conținutul de apă lucru .....	61
4.2.2 Conținutul de cenușă.....	62
4.2.3 Conținutul total de azot.....	63
4.2.4 Conținutul total de lipide.....	64
4.2.5 Conținutul de glucide libere.....	65
4.2.6 Valoarea nutritivă.....	67
4.2.7 pH-ului și aciditatea liberă.....	69
4.3 Rezultate și discuții privind determinare a compușilor biologic activi .....	70
4.3.1 Conținutul de aminoacizi liberi .....	70
4.3.2 Conținutul de acizi grași.....	76
4.3.3 Conținutul de polifenoli totali .....	83
4.3.4 Conținutului total de flavonoide .....	85
4.3.5 Identificarea compușilor fenolici individuali.....	86
4.4 Rezultate și discuții privind activitatea antioxidantă.....	106
4.4.1 Metoda DPPH .....	106
4.4.2 Metoda TEAC.....	107
4.4.3 Metoda FRAP .....	108

4.5 Rezultate și discuții privind activitatea antimicrobiană .....	110
5. Rezultate și discuții privind polenul fermentat artificial.....	113
5.1 Rezultate și discuții privind originea botanică .....	114
5.2 Rezultate și discuții privind determinarea valorii nutritive .....	115
5.2.1 Conținutul de apă.....	115
5.2.2 Conținutul de cenușă.....	116
5.2.3 Conținutul de proteine.....	117
5.2.4 Conținutul de lipide.....	118
5.2.5 Conținutul de glucide libere.....	119
5.2.6 Valoarea nutritivă.....	120
5.2.6 pH-ului și a acidității.....	122
5.3 Rezultate și discuții privind conținutul de compuși biologic activi.....	123
5.3.1 Conținutul de aminoacizi.....	123
5.3.2 Rezultate și discuții privind conținutul de acizi grași .....	126
5.3.3 Conținutul de polifenoli totali .....	131
5.3.4 Conținutul de flavonoide totale.....	132
5.3.5 Identificarea compușilor fenolici individuali.....	133
5.4 Rezultate și discuții privind activitatea antioxidantă.....	136
5.4.1 Metoda DPPH .....	137
5.4.2 Metoda TEAC.....	137
5.4.3 Metoda FRAP .....	138
5.5 Rezultate și discuții privind activitatea antimicrobiană .....	140
6. Concluzii și recomandări.....	143
6.1 Concluzii privind păstura naturală.....	143
6.2 Concluzii privind polenul fermentat.....	144
Elementele de originalitate ale tezei .....	147
Perspective de viitor.....	148
Bibliografie.....	149



# Contents

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>17</b>
<b>FIRST PART.....</b>	<b>19</b>
<b>LITERATURE REVIEW .....</b>	<b>19</b>
<b>1. BEE BREAD – GENERAL REMARKS .....</b>	<b>21</b>
1.2 Chemical compositon of bee bread .....	23
1.2.1 Water content .....	24
1.2.2 Ash content.....	25
1.2.3 Protein and amino acids .....	25
1.2.4 Lipids and fatty acids.....	26
1.2.5 Free sugars .....	27
2. Bee bread – Valuable source of biological active compounds.....	28
2.1 Polyphenolic compounds in bee bread .....	28
1.3.2 UV absorbance of phenolic compounds .....	31
1.3.3 Antioxidant capacity of bee bread .....	34
1.3.4 Antimicrobial activity.....	36
<b>SECOND PART .....</b>	<b>23</b>
<b>ORIGINAL RESEARCH.....</b>	<b>23</b>
<b>PURPOSE AND OBJECTIVES OF THE THESIS .....</b>	<b>39</b>
<b>3. Material and experimental method .....</b>	<b>40</b>
3.1 BIOLOGIC MATERIAL.....	40
3.2 EXPERIMENTAL METHODS.....	41
3.2.1 Botanical origin determination of analyzed samples - palynologic analysis .....	41
3.2.2 Fizico-chemical for determination of nutritive value.....	42
3.2.2.1 Determination of moisture .....	42
3.2.2.2 Ash determination .....	42
3.2.2.3 Determination of total nitrogen content.....	43
3.2.2.4 Determination of total lipid content .....	43
3.2.2.5 Determination of free sugars content .....	44
3.2.2.6 Determination of nutritive value .....	45
3.2.2.7 Determination of pH and free acidity .....	45
3.2.3 Methods for biologically active compounds determination.....	45
3.2.3.1 Determination of free amino acid content.....	45
3.2.3.2 Fatty acids determination .....	46

3.2.3.3 Preparation of extracts for UV-VIS spectrophotometric analysis .....	47
3.2.3.4 Determination of total polyphenolic content .....	47
3.2.3.5 Determination of total flavonoid content .....	47
3.2.3.6 Preparation extracts for HPLC/DAD .....	48
3.2.3.7 HPLC-DAD analysis of flavonoids and phenolic acids .....	48
3.2.4 Determination of antioxidant capacity .....	49
3.2.4.1 DPPH radical scavenging capacity .....	49
3.2.4.2 ABTS radical scavenging capacity (TEAC method) .....	50
3.2.4.2 Ferric reducing antioxidant potential (FRAP method) .....	50
3.2.5 Antimicrobial activity of bee bread .....	51
3.2.5.1 Preparation of bee bread extracts for antimicrobial activity .....	51
3.2.5.2 Bacterial strains and their cultivation .....	51
3.2.5.3 Antimicrobial activity assay and identification of minimum inhibitory concentration .....	52
3.2.6 Protocol for obtaining artificial bee bread type .....	52
3.3 Statistical analyzis of results .....	53
RESULTS AND DISCUSSIONS .....	54
4. RESULTS AND DISCUSSIONS REGARDING BEE BREAD SAMPLES .....	54
4.1 Results and discussions regarding the palynological analysis .....	54
4.2 Results and discussions regarding determination of nutritive value .....	61
4.2.1 Water content .....	61
4.2.2 Ash content .....	62
4.2.3 Total nitrogen content .....	63
4.2.4 Total lipid content .....	64
4.2.5 Free sugars content .....	65
4.2.6 Nutritive value .....	67
4.2.7 pH and free acidity .....	69
4.3 Results and discussions regarding biologically active compounds determination .....	70
4.3.1 Free amino acid content .....	70
4.3.2 Fatty acids content .....	76
4.3.3 Total polyphenolic content .....	83
4.3.4 Total flavonoid content .....	85
4.3.5 Identification of individual phenolic compounds .....	86
4.4 Results and discussions regarding antioxidant activity .....	106
4.4.1 DPPH method .....	106
4.4.2 TEAC method .....	107

4.4.3 FRAP method.....	108
4.5 Results and discussions on antimicrobial activity .....	110
5. Results and discussions on artificially fermented pollen .....	113
5.1 Results and discussions regarding botanical origin.....	114
5.2 Results and discussions regarding determination of nutritive value.....	115
5.2.1 Water content .....	115
5.2.2 Ash content.....	116
5.2.3 Proteins content.....	117
5.2.4 Lipids content .....	118
5.2.5 Free sugars content.....	119
5.2.6 Nutritive value.....	120
5.2.6 pH and acidity value .....	122
5.3 Results and discussions regarding the biologicaly active compounds .....	123
5.3.1 Free amino acids content .....	123
5.3.2 Results and discussions regarding fatty acids content .....	126
5.3.3 Total polyphenols content .....	131
5.3.4 Total flavonoid content .....	132
5.3.5 Identification of individual phenolic compounds.....	133
5.4 Results and discussions regarding antioxidant activity.....	136
5.4.1 DPPH method .....	137
5.4.2 TEAC method.....	137
5.4.3 FRAP method.....	138
5.5 Results and discussions on antimicrobial activity .....	140
6. Conclusions and recommendations .....	143
6.1 Conclusions regarding natural bee bread .....	143
6.2 Conclusions regarding fermented bee pollen .....	144
Originality elements of the thesis .....	147
Future perspective .....	148
References .....	149





## INTRODUCERE

## INTRODUCTION

Produsele naturale, care asigură doza zilnică de nutrienți au câștigat o importanță comercială tot mai mare în ultimii ani. În prezent acest interes se manifestă în mod clar printr-o tendință de a căuta produse alimentare care asigură pe lângă nutrienții de bază și un plus de compuși biologic activi care aduc beneficii sănătății consumatorului, cum sunt alimentele funcționale și nutraceuticele.

Produsele apicole au fost utilizate de secole atât în dieta umană, cât și în medicina tradițională, datorită proprietăților nutriționale și fiziologice și pentru efectele lor benefice asupra organismului uman (KROYER și HEGEDUS, 2001).

Pentru obținerea păsturii în mod natural albinele preseză polenul colectat, în celulele fagurilor, la care mai adaugă salivă, nectar și miere (BOGDANOV, 2016). Amestecul de polen sub influența temperaturii, a enzimelor și a microbiotei naturale din polen se transformă în păstură și reprezintă principala sursă proteică pentru stup (BRODSCHNEIDER, 2010).

Studiile anterioare au arătat că păstura are o biodisponibilitate mai ridicată decât polenul și este mai ușor de digerat de către organismul uman reprezentând o sursă naturală de proteine și aminoacizi, motiv pentru care a câștigat din ce în ce mai multă popularitate printre consumatori în ultima perioadă.

Din păcate studiile care descriu calitățile nutritive și proprietățile biologice ale păsturii sunt extrem de puține comparativ cu celelalte produse apicole, iar de un standard de calitate nici nu poate fi vorba.

Metodele de extracție ale păsturii din faguri sunt unele extrem de invazive, implicand distrugerea fagurelui, iar randament de extracție este unul foarte mic, motiv pentru care biotehnologiile în continua dezvoltare au căutat metode alternative pentru obținerea acestui produs.

Astfel cercetarea științifică întreprinsă în cadrul acestei lucrări, a avut ca și motivație necesitatea obținerii și caracterizării unui produs cu potențial bioactiv pe bază de polen care să reprezinte o legătură între sănătatea umană, biotehnologiile alimentare și cercetarea aplicată și care să ajute la acceptarea de către consumator a unui astfel de produs.

De asemenea este extrem de importantă cunoașterea în detaliu a potențialului păsturii naturale și propunerea unui standard de calitate pentru acest produs.

În acest context, lucrarea de față dorește să aducă o contribuție importantă în ceea ce privește studiul păsturi și al unui produs tip păstură, din punct de vedere al compoziției chimice și al compușilor biologic activi cu proprietăți antioxidante și antimicrobiene.

Lucrarea de față este structurată în două părți principale. În prima parte, Capitolele 1 și 2, este prezentat stadiul actual al cunoașterii în conformitate cu obiectivele propuse, tratându-se aspecte legate de păstura produsă de albine și cea obținută artificial cu accent pe compoziția chimică, compușii biologic activi din clasa polifenolilor și activitatea antioxidantă și antimicrobiană. Partea a doua (Capitolele 3-6) cuprinde contribuția personală, rezultate, discuții, concluzii și perspective de viitor pentru cercetare în ceea ce privește păstura și polenul fermentat.

**PARTEA ÎNTÂI**  
**FIRST PART**

**STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII**  
**LITERATURE REVIEW**



## 1. PĂSTURA – GENERALITĂȚI

### 1. BEE BREAD – GENERAL REMARKS

Un număr din ce în ce mai mare de oameni apreciază nu numai efectul terapeutic al mierii, ci și al altor produse apicole cu aplicabilitate largă în apiterapia. Păstura este un produs unic, care are o importanță deosebită pentru albine, dar și pentru om. Păstura este dificil de obținut, iar prețul ei este de câteva ori mai mare decât prețul mierii (BARAJAS și colab., 2012; VÁSQUEZ și OLOFSSON, 2009).

Păstura este un amestec de polen, miere și saliva a albinelor, care trece prin procesul de fermentație în interiorul stupului fiind folosit de către acestea ca sursă de proteine (BRODSCHNEIDER și CRAILSHEIM, 2010). Grauncioarele de polen colectate de către albine pot fi depozitate în orice celulă goală, aproape de puiet, care nu este pregătită pentru a depune ouă de către regină (CAMAZINE, 1991). De asemenea, albinele pot alege o celulă care deja are depozite de polen și încă nu este plină. Acest polen este supus ulterior prelucrării de către albinele doici, care îl presează cu capul în celulele fagurelui. În timpul procesului de presare, albinele adaugă secreții glandulare cu enzime, microorganisme, nectar sau miere din stomac (ANDERSON și colab., 2014) iar după ce celula este aproape plină adaugă deasupra un strat de miere și uneori un strat subțire de ceară pentru a sigila celula. Acest amestec de polen suferă diferite procese biochimice datorate acțiunii enzimelor provenite din secrețiile glandulare, a microorganismelor, a umidității și temperaturii (aproximativ 35 °C), permițând astfel transformarea și conservarea polenului depozitat. Maturarea păsturii durează în jur de două săptămâni (NAGAI și colab., 2004) după care se observă modificarea compoziției chimice (ANĐELKOVIĆ și colab., 2012; HERBERT și SHIMANUKI 1978).

Microorganismele care asigură conversia păsturii pot produce vitamine, enzime, lipide (GILLIAM și colab., 1989) substanțe cu efecte antimicrobiene (ABOUDA și colab., 2011; AUDISIO și colab., 2005) (JACK și colab., 1995) și acizi organici precum acizi grași și acid lactic (OLOFSSON și colab., 2014).

Fermentația păsturii începe cu o mare varietate de specii de microorganisme, inclusiv ciuperci, drojdii și bacterii provenite din polenul colectat și microbiota intestinală a albinelor. Procesul de fermentație urmează o succesiune a comunităților microbiene până când se dezvoltă speciile bacteriene producătoare de acid lactic (în principal *Lactobacillus* ssp. și *Bifidobacterium* ssp.) care reduc pH-ul mediului și reduc concomitent numărul de microorganisme (ANDERSON și colab., 2014; GILLIAM 1979).

Păstura astfel obținută poate fi consumată de albine în timpul prelucrării, dar excedentul acoperit cu miere și închis este păstrat pentru utilizare ulterioară. Păstura este esențială pentru dezvoltarea sănătoasă a coloniei de albine (BRODSCHNEIDER și CRAILSHEIM, 2010). Valoarea protectivă și bioactivă a polenului de albine se datorează

conținutului de compuși polifenolici (ESTEVINHO și colab., 2012; GRAIKOU și colab., 2011), grași (FEAS și colab., 2012; MĂRGĂOAN și colab., 2014) și prezența aminoacizilor esențiali, a vitaminelor și fitosterolilor (BOGDANOV, 2017).

Studiile anterioare au arătat că păstura are o biodisponibilitate mai bună decât polenul (CAMPOS și colab., 2010; HABRYKAȘI colab., 2016) deoarece învelișul exterior al acestuia, cunoscut sub numele de exină, alcătuit din sporopolenină, care îi oferă rezistență chimică la eliberarea completă a nutrienților. Exina este responsabilă pentru capacitatea limitată de absorbție a substanțelor nutritive și a substanțelor bioactive care se găsesc în interiorul grăunciorului de polen (ATKIN și colab., 2011), dar în păstură acest înveliș este parțial distrus prin fermentație și conținutul bogat funcțional și energetic al polenului poate fi asimilat și utilizat mai ușor (IVANIŠOVÁ și colab., 2015). În plus, este mai bine absorbită de corpul uman decât polenul deoarece componentele pâinii de albine sunt fermentate parțial și sunt mai ușor asimilate de organism (BARENE și colab., 2014). Diferite simulări *in vitro* ale digestiei umane au sugerat faptul că învelișul exterior al polenului este doar parțial digerat (între 48 și 59%) (RIMPLER, 2003; CAMPOS și colab., 2010) fapt care a fost folosit de unii cercetători ca dovadă a rezistenței peretelui exterior al polenului, chiar și la acidul gastric. În ciuda acestor constatări, un alt studiu privind digestibilitatea polenului și a păsturii (ZULUAGA și colab., 2015) a arătat diferențe semnificative între păstură (79.1 g proteină digerată/100 g proteină totală) și polenul de albine (63.9 g proteină digerată/100 g total proteină). Cu toate acestea, fiind un test *in vitro*, acesta reflectă variația structurii polenului și o mai mare disponibilitate a compușilor nutritivi și bioactivi în păstură.

Pe de altă parte, unii autori susțin că păstura este o formă de conservare și nu de conversie a nutrienților, având în vedere concentrația ridicată de zaharuri simple (provenite din miere și nectar) în polenul corbicular și procentul de polen stocat în stup (40-50%) s-a sugerat că păstura este doar o formă de conservare a polenului. Polenul depozitat are după procesul de fermentație o aciditate mai ridicată ( $\text{pH} < 4.5$ ) și conține 40–50% zaharuri simple (ANDERSON și colab., 2011; NICOLSON, 2011).

O schimbare consecventă detectată în polenul depozitat este pierderea de amidon, o substanță rapid convertită de către amilaza secretată de glandele hipofaringiene ale albinelor. Speculația că polenul depozitat în stup este produsul conversiei nutrienților a fost întărit în permanență de comunitatea științifică, dar niciodată nu a fost documentat cu adevărat (ANDERSON și colab., 2014).

În stup, în general, bacteriile lactice sunt cele care generează fermentația. Belhadj și colab., (2014) a izolat următorii lactobacili din polenul corbicular: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus ingluviei*, *Pediococcus pentosaceus* și *Lactobacillus acidipiscis*. VÁSQUEZ și OLOFSSON (2009) a afirmat că păstura este fermentată de microbiota stomacului albinelor. Această microbiotă este alcătuită în principal, de bacterii lactice (*Lactobacillus spp.* și *Bifidobacterium spp.*). Recent Olofsson și colab., (2014) a izolat câteva bacterii noi din

stomacul albinei din grupul *Lactobacillus kunkeei*, *Lactobacillus buchneri* și *Lactobacillus delbrueckii*. Este evident că diversitatea bacteriilor lactice este imensă și probabil toate aceste bacteriile au impact asupra producției de păstură în stup și implicit la creșterea acidității produsului.

Concentrația de acid lactic în păstură este de șase ori mai mare decât în polen (NAGAI și colab., 2004). Păstura obținută din polen de mesteacăn a conținut de șase ori mai mult acid lactic decât polenul provenite din aceeași plantă. Procesul de transformare a polenului în păstură este însoțit de reacții biochimice. Se presupune că acesta este rezultatul activității microorganismelor, în special a bacteriilor lactice (ANĐELKOVIĆ și colab., 2012). Prezența acidului lactic împreună cu pH-ul scăzut ajută la conservarea păsturii pe o perioadă de timp mai lungă.

## 1.2 Compoziția chimică a păsturii

### 1.2 Chemical composition of bee bread

Din studiile existente până în prezent se poate afirma că păstura are o compoziție și o valoare nutritivă asemănătoare cu cea a polenului colectat de către albine (CAMPOS și colab., 2008; NAGAI și colab., 2004; TOMÁS și colab., 2017; ZULUAGA și colab., 2015).

Păstura constituie principala sursă de proteine pentru albine (BRODSCHNEIDER și CRAILSHEIM, 2010), iar pe baza studiilor existente în literatură despre polenul de albine păstura a început să fie un produs al stupului din ce în ce mai utilizat în apiterapie sau ca și supliment alimentar (NAGAI și colab., 2004; KROYER și HEGEDUS, 2001).

Valoarea biologică ridicată a păsturii se datorează prezenței tuturor aminoacizilor esențiali și a acizilor grași esențiali. La care se adaugă echipamentul enzimatic deosebit de bogat (oxidoreductaze, hidrolaze, transferaze, izomeraze, lipaze). Deasemenea, compușii fenolici, pigmentii carotenoidici și complexul de vitamine, în special din grupul B conferă păsturii o activitate biologică ridicată (LEJA și colab., 2007).

Păstura are o compoziție chimică extrem de variată, această variație se datorează faptului că păstura este un amestec neomogen de polen fermentat (ANDERSON și colab., 2014). Fiecare grăuncior de polen care este depozitat în celulele fagurilor de către albine, cu scopul de a produce păstură și poate fi alcătuit din polen colectat de la mai mult specii florale (ALMEIDA-MURADIAN și colab., 2005). În acest fel, amestecul final va avea în componență polen colectat de la un număr de specii florale extrem de mare.

Până în prezent sunt doar câteva publicații care detailează compoziția chimică a acestui produs (BALTRUŠAITYTE și colab., 2007; ČEKŠTERYTĖ și colab., 2008; ISIDOROV și colab., 2009; SOBRAL și colab., 2017), cantitatea de informații disponibile

în literatura de specialitate despre păstură rămâne limitată, cu puține rapoarte asupra compoziției chimice a acestui amestec.

Compoziția chimică a păsturii după diverși autori, este prezentată în tabelul 1.

**Tabelul 1 /Table 1 Compoziția chimică a păsturii raportată de diferiți autori**

*Chemical composition of bee bread by different authors*

Component Component	Conținut Content	Metoda de cuantificare Quantification method	Referințe References
<b>Apă (%)</b>	18.14 7.8 – 19.1 24 14 – 17	Uscare la etuvă	(Fuenmayor și colab., 2014) (Zuluaga și colab., 2015) (Barene și colab., 2014) (Ceksteryte și Jansen, 2012)
<b>Proteine (%)</b>	14 – 22 21 19 – 27 24	Metoda Kjeldahl  Metoda Bradford	(Tomás și colab., 2017) (Salazar-González și Díaz-Moreno, 2016) (Zuluaga și colab., 2015) (Degrandi-Hoffman și colab., 2015)
<b>Lipide (%)</b>	1.60 – 5.50 3.6 – 14.9 6.69	Metoda Soxhlet	(Zuluaga și colab., 2015) (Tomás și colab., 2017) (Salazar-González și Díaz-Moreno, 2016)
<b>Cenușă (%)</b>	3.5 2.19 – 2.60	Calcinare	(Tomás și colab., 2017) (Zuluaga și colab., 2015)
<b>Carbohidrați (%)</b>	24 – 34  58 – 78	Diferență după determinarea cenușii, lipidelor și a proteinelor	(Barene și colab., 2014)  (Tomás și colab., 2017)
<b>Glucoză (mg/g)</b>	67 – 135	HPLC-IR	(Tomás și colab., 2017)
<b>Fructoză (mg/g)</b>	117 – 264	HPLC-IR	(Tomás și colab., 2017)

### 1.2.1 Conținutul de apă

#### 1.2.1 Water content

Păstura este un produs al stupului care are o umiditate cuprinsă între 14-25%. Păstura care a fost supusă unui proces de deshidratare și care se găsește cel mai adesea în comerț are un conținut de apă între 6-8%. Cantitatea de apă este un parametru de calitate extrem de important, un conținut ridicat de apă duce la activarea creșterii microorganismelor sau enzimelor, fapt care influențează direct calitatea produsului. Valorile raportate pentru acest parametru variază în limite foarte largi. ZULUAGA și colab., (2015) a raportat valori între 7.8- 19.1%, iar BARENE și colab., (2014) a raportat o medie de 24%, Se poate observa că umiditatea păsturii este mult mai scăzută decât cea a polenului proaspăt, care de obicei înregistrează o valoare medie a umidității de 32% (CAMPOS ȘI COLAB., 2015). Umiditatea ridicată din polen reprezintă un mediu ideal pentru dezvoltarea microorganismelor acesta fiind motivul pentru care polenul este mult mai perisabil decât păstura (ANDERSON și colab., 2014).



## **1.2.2 Conținutul de cenușă**

### **1.2.2 Ash content**

Conținutul total de minerale al păsturii (cenușa) raportat în studiile din literatură a variat între 2 și 4%. Păstura conține și o cantitate însemnată de minerale precum Ca, P, K, Mg, Fe, Zn, Mn, Na (ANĐELKOVIĆ și colab., 2012). În păstură se găsește o cantitate importantă de potasiu (0.74%), calciu și fosfor (0.65%). De asemenea păstura conține cantități imăportante de fier (121.99 mg/ kg) și zinc (44.09 mg/kg).

Potasiul a fost elemental identificat în cea mai mare cantitate în păstura românească și a variat între 3605.37 - 3921.29 mg/kg, conținutul de calciu între 1165.84-1206.57 mg/kg. iar conținutul de fier a fost cuprins între 44.82-65.38 mg/kg. Conținutul de zinc a fost raportat ca fiind între 29.54- 31.85 mg/kg în probele analizate (STANCIU și colab., 2009).

Nivelul de minerale din polen variază considerabil în cursul anului datorită diferențelor de origine florală a polenului (HERBERT și SHIMANUKI 1978; KELLER și colab., 2005). Cu toate acestea, se așteaptă ca alți factori, cum ar fi condițiile geografice și solul, să afecteze conținutul mineral al păsturii (STANCIU și colab., 2009).

## **1.2.3 Proteine și aminoacizi**

### **1.2.3 Protein and amino acids**

Conținutul de proteine al păsturii este unul din caracteristicile nutriționale cele mai apreciate. Conform datelor din literatură, cantitatea de proteine din păstură a fost încadrată între 14.1 și 37.3% evaluată prin utilizarea factorului N x 6,25, având o medie de 23,1% Este de așteptat ca păstura să aibă conținutul de proteine similar cu cel din polen (FUENMAYOR și colab., 2014), deoarece procesul biochimic prin care trece polenul în stup vizează degradarea învelișului exterior al grăunciorului de polen, și de a conserva compușii nutritive (ZULUAGA și colab., 2015).

Proteinele găsite în păstură includ unele enzime, cum ar fi amilaza, fosfataza și glucoza-oxidaza (SALAZAR-GONZÁLEZ și DÍAZ-MORENO, 2016).

Proteinele din polen sunt degradate la peptide și aminoacizi în timpul procesului de fermentație. Studiul realizat de DEGRANDI-HOFFMAN și colab., (2015) a arătat că concentrația de proteine în polen este mai mare decât cea din păstură, în timp ce concentrațiile de aminoacizi au fost mai mici în majoritatea probelor de polen. Un nivel ridicat de aminoacizi liberi poate fi rezultatul unei activități a enzimelor proteolitice specifice care determină ruperea legăturilor peptidice din lanțul polipeptidic (SZCZÊSNA, 2006).

Păstura conține, de asemenea, aminoacizi precum: acid glutamic, acid aspartic, prolină, găsită în cea mai mare cantitate, arginină, valină, histidină, leucină, izoleucină, lizină, metionină, triptofan, fenilalanină, treonină, cisteină, tirozină, alanină, glicină și serină (BARENE și colab., 2014). Păstura conține totii aminoacizii esențiali necesari omului (DEGRANDI-HOFFMAN și colab., 2015; WU, 2009). Prezența tuturor

aminoacizilor esențiali este asociată cu calitatea produsului și fac din păstură un excelent supliment alimentar, iar echilibrul optim între aminoacizi în dietă este esențial pentru homeostazia întregului corp (WU, 2009).

Lizina este direct implicată în metilarea proteinelor, activitatea antivirală, în absorbția calciului, sinteza și funcția collagenului, iar histidina este direct implicată în metilarea proteinelor; structura și funcția hemoglobinei; ajută la producerea unor dipeptide antioxidante și indirect prin histamine (este un precursor al histaminei - această este eliberată de celulele din sistemul imunitar în timpul reacțiilor alergice) în reacția alergică; are efect vasodilatator și în modularea răspunsului imun din piele (ELANGO ȘI PENCHARZ, 2009; WU, 2009).

Prolina este direct implicată în structura și funcția collagenului, ajută funcția neurologică și este indirect implicată în sinteza AND-ului, proliferarea limfocitelor, în sinteza ornitinei, citrulinei, argininei și poliaminei. Deși este sintetizată de către organismul uman, au fost observate scăderi ale nivelului de prolină din organism în cazul efortului prelungit și astfel este posibil ca persoanele care sunt expuse efortului prelungit (ex. sportivi) să fie nevoite să consume suplimente alimentare pe bază de prolină (WU, 2009).

Concentrația anumitor aminoacizi (triptofan) poate scădea în păstură comparativ cu polenul. Acest fenomen poate fi legat de activitatea microbiană. Unele microorganisme pot folosi aminoacizii ca sursă de carbon și energie pentru creșterea lor.

### **1.2.4 Lipide și acizi grași**

#### **1.2.4 Lipids and fatty acids**

Lipidele reprezintă o sursă de energie pentru albine și sunt importante în sinteza corpului gras și a glicogenului, sau în structura membranelor celulare (HERBERT, 1997). Lipidele împreună cu acizii grași și sterolii au o mare importanță în dezvoltarea coloniei de albine, nutriție și reproducție (MĂRGHITAȘ, 2015).

Valorile raportate în studiile din literatură au fost cuprinse între 1.60 și 15%. Conținutul total de lipide a avut fluctuații foarte mari în studiul realizat de TOMÁS și COLAB., (2017) care a raportat valori ale lipidelor totale din păstura portugheză cuprinse între 3.6 și 14.9%, iar în studiul realizat de Zuluaga și colab., 2015 pe păstura columbiană conținutul de lipide a fost cuprins între 1.65-6.50%.

Conținutul de lipide variază foarte mult și este dependent de conținutul de acizi grași, carotenoide și vitamine prezente în polen (HUMAN și NICOLSON, 2006; BASTOS și colab., 2004) Acizii grași sunt lipidele care contribuie la valoarea biologică a acestui produs (URCAN și colab., 2017).

Un total de 37 de acizi grași, incluzând 20 saturați și 17 nesaturați, au fost identificați în probele de păstură de diferite origini botanice (KAPLAN și colab., 2016). Toate probele analizate au fost considerate monoflore și au avut în compoziție polen de *Trofolium pratense* > 85%, *Gossypium hirsutum* L. 65.6%, *Citrus spp.* 61.4 %, Alți taxoni

de polen găsiți în probele testate au fost *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Brassicaceae*, *Rhamnaceae*, *Apiaceae*, *Myrtaceae* și *Rosaceae*. Treizeci și unu din totalul acizilor grași identificați au fost comuni pentru toate cele 8 probe analizate.

ČEKSTERYTĚ și colab. (2008) a identificat 22 de acizi grași în probe de păstură care aveau în componență diferite procente de polen de *Brassica napus*. Acidul arachidonic și acidul oleic au reprezentat 16%, respectiv 15%, în timp ce acidul arachidic a fost identificat în procent de 12%, acidul eicosapentaenoic - 8%,  $\alpha$ -linoleic - 5% și acidul docosahexaenoic - 5%.

Investigațiile asupra acizilor grași cu lanț lung din păstură care are origine botanică diferită au arătat că această are un raport mai mare  $\omega$ -3 /  $\omega$ -6 care este mai potrivit pentru dieta umană decât multe uleiuri de plante (ČEKSTERYTĚ și JANSEN, 2012).

Raportul optim dintre acizii grași nesaturați  $\omega$ -6:  $\omega$ -3 din dietă este considerat a fi 1: 2, dar în dieta modernă acest raport este în dezechilibru (1: 15-20). Polenul și păstura reprezintă o sursă de acizi grași nesaturați care ar putea ajuta la restabilirea acest dezechilibru.

Acizii grași nesaturați au efecte benefice asupra sănătății umane, cum ar fi reducerea nivelului trigliceridelor și a colesterolului din sânge, activitate antiinflamatorie și antitrombotică. Literatura actuală susține ideea conform căreia polenul și păstura sunt surse de acizi grași polinesaturați, acizi grași esențiali pentru nutriția umană. Acizii grași polinesaturați nu pot fi sintetizați în organismul uman și prin urmare trebuie obținuți din alimente. În acest sens, păstura și polenul pot fi considerate o potențială sursă de PUFA în dieta umană (KAPLAN și colab., 2016; MĂRGĂOAN și colab., 2014).

Diferențele mari dintre rezultatele raportate de diverși autori pot fi explicate prin originea botanică diferită a probelor studiate.

Un aspect important de menționat este acela că acizii grași au proprietăți bactericide și antifungice, jucând un rol important în inhibarea creșterii bacteriilor precum, *Paenibacillus*, *Melissococcus pluton* și a altor specii bacteriene care pot provoca boli albinelor. Pentru larve și pentru albinele doici acizii grași sunt o importantă sursă de energie. Albinele utilizează lipidele pentru producerea corpului gras pentru iernare și pentru producerea lăptișorului de matcă (MĂRGĂOAN și colab., 2014).

## 1.2.5 Glucidele libere

### 1.2.5 Free sugars

Studiul realizat de MARKIEWICZ-ZUKOWSKA și colab., (2013) a arătat că păstura conține o cantitate semnificativă de carbohidrați, ceea mai mare parte fiind reprezentată de monozaharide cum este fructoza și glucoza, iar dintre polizaharide amidonul, celuloza, hemiceluloză, polenina, pectine (KRELL 1996; MĂRGHITAȘ, 2015).

Carbohidrații au fost de asemenea identificați de către ISIDOROV ȘI COLAB., (2009) ca fiind prezenți într-o cantitate foarte mare în păstură, până la 80% în unele probe. Glucidele din păstură au fost menționați și de BARENE ȘI COLAB., (2014) ca fiind

glucoza, fructoza, zaharoza, arabinoza, galactoza, lactoza, dar din păcate nu au fost prezentate și valorile individuale ale acestora, ci doar cantitatea totală de carbohidrați care a fost cuprinsă între 24 și 34%.

Există puține publicații despre profilul glucidic al polenului și chiar mai puțin despre profilul glucidelor din păstură. Studiul realizat de (SZCZESNA, 2007) este unul dintre puținele studii existente în literatură care a identificat și a cuantificat zaharurile individual și nu ca și diferență după determinarea proteinelor și lipidelor. SZCZESNA (2007) a studiat glucidele din polenul de albine colectat din diferite țări (Polonia, Coreea de Sud și China) folosind tehnica HPLC. Studiul a arătat că, conținutul de glucide din polen este în medie de 40%. Fructoza a fost glucidul identificat în cele mai mari cantități. Aceasta a reprezentat 46% din conținutul total de zaharuri din probele examinate, urmată de glucoză cu un procent de 37%. Din dizaharidele analizate zaharoza a reprezentat 8% și maltoza 7%, iar trehaloză și turanoză aproximativ 1% fiecare.

TOMÁS și colab., (2017) au analizat glucidele din păstură prin metoda HPLC-IR, iar profilele cromatografice au arătat un conținut ridicat de fructoză și glucoză, iar arabinoza a fost de asemenea identificată în două probe. Prezența exclusivă a polenului de *Anthemis arvensis* în aceste două probe poate fi legată de prezența acestui tip de glucid. Analiza cantitativă a arătat că fructoza a fost glucidul care a avut cele mai ridicate valori, între 99 și 272 mg / g. Conținutul de glucoză a fost cuprins între 66 și 175 mg/g și a fost tot timpul mai mic decât cel de fructoză.

Potrivit lui ROULSTON și CANE, (2000) păstura spre deosebire de polenul proaspăt recoltat de către albine, conține mai multe glucide simple și mult mai puțin amidon, ceea ce îi asigură o mai bună absorbție la nivel intestinal, reprezentând o sursă rapidă de energie.

## **2. Păstura -importantă sursă de compuși biologic activi**

### **2. Bee bread – Valuable source of biological active compounds**

#### **2.1 Compușii fenolici din păstură**

##### **2.1 Polyphenolic compounds in bee bread**

Cele mai comune dintre flavonoide sunt de departe, flavonele și flavonolii, care se regăsesc aproape exclusiv sub formă de glicozide (derivați glucidici ai agliconilor) în plante. Flavonoidele și unii acizi fenolici, au rol funcțional în plante, (GOULD și LISTER, 2006), antioxidant și antimicrobian. Flavonoidele au rol și în colorarea florilor și a fructelor, sunt implicate în inițierea formării rădăcinilor și în creșterea tubului polinic. De asemenea acestea controlează activitatea enzimatică. (CLIFFORD și BROWN, 2006). Capacitatea flavonoidelor de a bloca radicalii liberi, este unul dintre principalele motive pentru care se crede că mâncarea bogată în flavonoide cum sunt fructele, legumele, ceaiul, vinul roșu etc., protejează împotriva bolilor degenerative oxidative cum sunt cancerul, artrita, hipertensiunea (CAMPOS și MARKHAM, 2007).

Păstura conține o cantitate considerabilă de polifenoli totali (compuși biologic activi) cu variații datorate originii botanice diferite a polenului (MĂRGHITAȘ și colab., 2009) precum și diverselor tehnici utilizate pentru extracția și cuantificarea lor. Conținutul în compuși fenolici ai păsturii a fost foarte puțin studiat și a fost raportat de puțini autori care au utilizat metode diferite de identificare și cuantificare (DURÁN și colab., 2014; ISIDOROV și colab., 2009; MARKIEWICZ-ZUKOWSKA și colab., 2013). Determinarea polifenolilor totali și a flavonoidelor totale sunt metode spectrofotometrice, simple, care sunt capabile să cuantifice conținutul total al acestor clase de compuși bioactivi, care sunt incriminați pentru activitatea antioxidantă, antibacteriană sau antitumorală a plantelor și implicit a polenului (GHELDOLF și colab., 2002).

ZULUAGA și colab., (2015) a determinat conținutul total de polifenoli în probele de păstură columbiană, iar alorile obținute au variat între 2.5 și 13.7 mg GAE / g. Cantități mai mari de polifenoli au fost determinate de către MARKIEWICZ-ZUKOWSKA și colab., (2013), care a raportat conținutul total de polifenoli din păstură ca având o medie de 24.60 mg GAE / g.

Conținutul de polifenoli din păstură și polen este cel mai ridicat când aceste produse sunt proaspete (10.1 mg GAE/păstură, 8.2 mg GAE/g polen). Depozitarea fără răcire reduce semnificativ conținutul acestor compuși (6.37 mg GAE / g păstură, 7.34 mg GAE / g polen) (TAVDIDISHVILI și colab., 2014)

Rezultatele indică faptul că în toate probele de păstură analizate, cantitatea de polifenoli variază atât în funcție de tipul de extracție, cât și de originea geografică (DURÁN și colab., 2014).

Carpes și colab., (2007) subliniază faptul că total compușilor fenolici nu variază numai în funcție de modul de extracție, ci și în funcție de originea botanică, fapt care indică o corelație directă cu originea florală. De asemenea, BALTRUŠAITYTEȘI colab., (2007) indică faptul că polifenoli variază în funcție de originea polenului, care depinde în mod clar de floră și locația geografică a acestuia.

TOMÁS și colab., (2017) a raportat un conținut total de polifenoli în păstura portugheză, între 14 mg GAE / g păstură și 84 mg GAE / g păstură. Aceste valori au fost mai mari decât cele raportate de alți autori (FEAS și colab., 2012) pentru polenul de albine portughez și pot fi explicate datorită biodisponibilității sporite a compușilor care rezultă din degradarea structurii polenului la fermentarea păsturii în stup, dar după cum am verificat în această lucrare, probabil originea polenului analizat a fost diferită având în vedere o gamă largă de posibilități.

Datele din literatura de specialitate referitoare la conținutul total de polifenoli ai păsturii românești au arătat o variabilitate semnificativă între probele care au în compoziție polen provenit de la diferite specii florale, dar și în ceea ce privește solventul utilizat la extracție. S-a raportat că cele mai ridicate cantități de polifenoli s-au

înregistrat în extractele metanolice (22.72 mg GAE g<sup>-1</sup>) și cele mai scăzute în extractele apoase (8.32 mg / g mg GAE g<sup>-1</sup>). (COCAN și colab., 2009).

Flavonoidele sunt compuși minoritari, dar de importanță foarte mare în păstură. Acești compuși influențează aspectul vizual al grăunciorului de polen (pigmentația) și gustul (astringența și gustul amar) (DEGRANDI-HOFFMAN și colab., 2015). În păstură și polen, majoritatea flavonoidelor se găsesc sub formă de glicozide (În principal flavonol-3-O- glicozid), cât și de aglicon, fiind de obicei foarte hidroxilați , cum ar fi kamferolul (EREL 2004; CAMPOS și colab., 2002).

ZULUAGA și colab. 2015 a raportat un conținut total de flavonoide cuprins între 1.9 și 4.5 mg Qe / g. În schimb, în studiul lui MARKIEWICZ-ZUKOWSKA și colab., (2013) conținutul total de flavonoide a variat între 32.72-37.15 mg QE/ g, dar în nici unul dintre aceste studii originea botanică nu a fost discutată. Este de așteptat ca păstura, care este un amestec de polen colectat de albine, să varieze foarte mult în compoziție.

În ceea ce privește conținutul de flavonoli și de flavone, extracția lor pare să fie influențată și de tipul solventului utilizat, cele mai ridicate valori au fost obținute în cazul extractelor de păstură metanolice (0.696 mg QE g<sup>-1</sup>), urmate de cele etanolice (15.84 mg QE g<sup>-1</sup>). Extractele apoase conțin cantități mai scăzute de flavonoli și flavone (0.168 mg QE g<sup>-1</sup>). (Cocan și colab., 2009). Flavonoidele sunt larg recunoscute ca fiind markeri chemotaxonomici în plante (YANG și colab., 2012).

Primul care a prezentat date cu privire la compoziția biochimică a păsturii a fost ISIDOROV și colab., (2009). În acest studiu s-a folosit metoda GC-MS, și au fost identificați patru acizi fenolici (acidul 4-hidroxybenzoic, acidul p-cumaric, acidul ferulic și acidul cafeic) și șase flavonoide, crisina, naringenina, kamferolul, isoramnetina, apigenina și quercetina.

Fracțiunile fenolice ale păsturii au fost analizate utilizând metoda HPLC de către BALTRUŠAITYTE și colab., (2007) și au identificat acidul p-cumaric, kamferolul, apigenina și crisina ca fiind prezente în probele de păstură după ce acestea au fost procesate termic, dar concentrațiile acestora au fost exprimate doar ca și aria picurilor. MARKIEWICZ-ŽUKOWSKA și colab., (2013) a identificat în păstura din Polonia, utilizând GC/MS și etanolul 95% ca și solvent, doi compuși fenolici: kamferolul și apigenina în timp ce TAVDIDISHVILI și colab., (2014) a folosit metoda HPLC-UV-VIS pentru a studia păstura din Georgia și a identificat prezența a trei flavonoide, naringina, rutina și quercetina, dar ceilalți compuși care au aparut pe cromatogramă nu au fost identificați.

Până în prezent, studiul realizat de SOBRAL și colab., 2017, este cel mai complex și raportează identificarea a 32 de flavonoide diferite în probele de păstură analizate. Compușii fenolici principali identificați în păstură au fost derivați flavonolici, în special, quercetina, kamferolul, miricetina, isoramnetina și herbacetina.

În polenul floral și în păstură, flavonoidele sub formă de aglicon au fost semnalate în puține cazuri, ex: naringenină, tricetină și 3-O-metil-quercetină în *Eucalyptus globulus* (CAMPOS și colab., 1997). În polenul aparținând familiei Myrtaceae

a fost identificată o flavonoidă rară, respective agliconul tricetinei, alături de alte flavonoide agliconice: miricetina, 3-o-metil-quercetina și luteolina ca fiind principalii componenși ai fracțiunii flavonoidice din polen (CAMPOS și colab., 2002).

TAVDIDISHVILI și colab., (2014) utilizând metoda HPLC cu detector UV/VISIBLE a raportat prezența naringinei ( $0.87 - 76.86 \text{ mg/kg}^{-1}$ ), rutinei ( $2.59 - 4.18 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) și quercetinei ( $3.86 - 19.32 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) în păstura georgiană. În cadru acestui studiu nu există referiri la originea botanică a păsturii analizate.

ČEKSTERYTE și colab., (2016) au analizat comparativ, prin tehnica HPLC, trei tipuri de păstură a căror origine botanică a fost identificată prin analiză palinologică. Astfel, în păstura cu procent majoritar de *Brassica napus* (37.9%) și *Carum carvi* (23.9%), *Centaurea cyanus* (16.3%), *Salix alba* (7.3%), *Sinapis arvensis* (7.6%) și proba cu polen majoritar de *Trifolium sp* (71.4%) și *Sinapis arvensis* (12.1%), *Brassica napus* (11.2%) și *Taraxacum officinales* (5.3%) au fost identificate și cuantificate următoarele flavonoide: vitezină ( $309 - 676.8 \text{ } \mu\text{g/g}$ ), rutina ( $41.1 - 798.3 \text{ } \mu\text{g/g}$ ), quercetina ( $274.1 - 495.8 \text{ } \mu\text{g/g}$ ), quercitrina ( $115.5 - 337.6 \text{ } \mu\text{g/g}$ ), isoramnetina ( $337.5 - 1210.1 \text{ } \mu\text{g/g}$ ), kamferol ( $39.9 - 496.8 \text{ } \mu\text{g/g}$ ), hiperozidă ( $55.8 - 1150 \text{ } \mu\text{g/g}$ ) și vitezin-O-ramnozidă ( $116.3 - 305.5 \text{ } \mu\text{g/g}$ )

Flavonoidele identificate în păstură sunt în marea lor majoritate forme glicozidate ale quercetinei, herbacetinei, kampferolului, isoramnetină, myricetină, metal-herbacetină, acetil-kampferol (SOBRAL și colab., 2017).

## 2.2 Absorbția în UV a compușilor fenolici

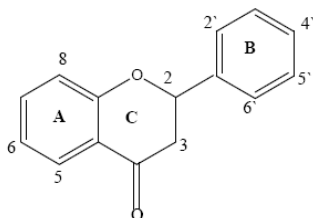
### 1.3.2 UV absorbance of phenolic compounds

Metoda HPLC/DAD a fost, pentru prima dată, folosită pentru studiul produselor apicole de către CAMPOS și colab. (1997) când s-a constatat faptul că aceste produse sunt bogate în compuși fenolici, în special flavonoide. Pentru identificarea și cuantificarea individuală a acestor flavonoide utilizarea metodelor HPLC este cea mai frecventă și eficientă. Primul pas în identificarea acestora implică interpretarea spectrelor de absorbție pentru a putea determina tipul compusului și clasa din care face parte, acid aromatic, dihidroflavone, flavone, flavonoli sau altele. Compararea cu spectrele de referință ar trebui să furnizeze aceste informații.

Spectrul unei flavonoide constă, în mod normal, în două benzi de absorbție în intervalul 240-285 nm (banda II, datorată absorbției inelului aromatic A) și 300-550 nm (banda I, datorată inelului B). Poziția precisă și intensitatea relativă a acestor benzi reprezintă o informație valoroasă pentru a putea identifica natura și tipul flavonoidelor. (SABATIER și colab., 1992). Flavonele și flavonolii au spectrul format din două benzi de absorbție maximă între 240-400 nm. Banda I prezintă absorbție în intervalul  $\lambda_{\text{max}} = 300-380 \text{ nm}$ , iar banda II în intervalul  $\lambda_{\text{max}} = 240-280 \text{ nm}$ . Banda I este asociată absorbției

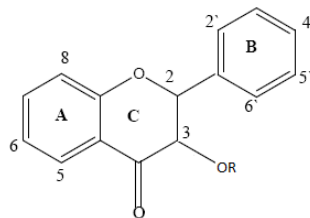
inelului B, corespunzător sistemului cinamoil, iar banda II absorbției inelului A corespondent al sistemului benzoil (CAMPOS și MARKHAM, 2007)

Reacțiile de substituție ale flavonoidelor pot avea loc la inelul A, B sau C. În figura 1 și 2 sunt prezentate nucleeele aromatice și siturile de substituție definite de poziția atomilor de carbon. Figura 3 ilustrează anumite caracteristici ale spectrului de absorbție al flavonoidelor precum banda I, IIa și IIb.



**Fig. 1. Structura de bază a unei flavone**

Fig. 1. The basic structure of a flavone



**Fig. 2. Structura de bază a unui flavonol**

Fig. 2. The basic structure of a flavonol

În tabelul următor este prezentat modul în care se pot deosebi flavonele de flavonoli (3-hidroxi flavone) cu ajutorul poziției benzii I.

**Tabelul 2/ Table 2 Amplitudinea benzii I pentru spectrele UV ale flavonelor și flavonolilor**

Amplitude of I band for UV spectra of flavones and flavonols

Tipul flavonoidei/ Type of flavonoid	$\lambda_{\max}$ – (nm)
Flavone	304-350
Flavonoli (OH-3 substituit)	328-357
Flavonoli (OH-3 liber)	352-385

Mărind gradul de substituție la inelul B al flavonelor și al flavonolilor, are loc o deviere batocromică a benzii I, pentru fiecare grupare hidroxi suplimentară. Pe de altă parte, când apar modificări la inelul B al flavonoidelor, nu are loc, în mod normal, nici o modificare la banda II.

**Tabelul 3/ Table 3  $\lambda_{\max}$  a benzii I pentru spectrele UV ale flavonolilor**

$\lambda_{\max}$  of the band I for the UV spectra of flavonols

Flavonol/Flavonol	Inelul A și C	Inelul B	$\lambda_{\max}$ (nm)
Kampferol	3,5,7	4'	367
Quercetină	3,5,7	3', 4'	370
Miricetină	3,5,7	3', 4', 5'	374

Banda II poate să apară sub forma a două picuri, denumite IIa și IIb. Banda IIa are o lungime de undă mai mare și este dependentă de substituțiile care au loc la inelul B. De exemplu, flavonele și flavonolii oxigenați în poziția 3' și 4' și cei oxigenați în poziția 3', 4', 5', apar sub forma a două benzi de absorbție, sau sub forma unei singure benzi cu absorbție maximă care prezintă o umbră în partea laterală între 250 și 275 nm, iar compușii oxigenați la poziția 4' prezintă doar o singură bandă.

Creșterea hidroxilării flavonelor și flavonolilor produce o deviație batocromică notabilă la banda II și un efect mai mic la banda I. Prezența sau absența grupării OH la atomul de carbon C5 are un efect notabil la ambele benzi ale spectrelor flavonelor. Când



OH la C5 este absent de la o flavonă sau un flavonol, ambele benzi apar la lungimi de undă inferioare (cu 3-10 nm mai puțin pentru banda I și 6-18 nm mai puțin pentru banda II) comparativ cu compușii echivalenți dar care au gruparea OH-5 (CAMPOS și MARKHAM, 2007).

Acizii fenolici de tipul acidului benzoic sau cinamic sunt frecvent regăsiți sub forma lor derivată în extractele de polen și păstură și apar mai ales ca și grupări acil atașate la glicozidele flavonoidelor. Când modelul de substituție pentru derivații acidului benzoic și pentru unii derivați ai acidului cinamic este simetric, spectrul este compus dintr-o singură bandă de absorbție. Exemplu: acidul benzoic, acidul galic, acidul cinamic, acidul p-hidrocibenzoic, acidul sinapic etc.

Când reacția de hidroxilare/metoxilare a acizilor fenolici se realizează la un atom de carbon aflat într-o poziție nesimetrică poate apărea o bandă de absorbție cu două picuri. Ex.: acidul cinamic monohidroxilat în poziția „orto-”, „meta-” și „para-”. În general, cu cât reacția de substituție are loc la un carbon mai apropiat de poziția „orto” cu atât separarea celor două benzi de absorbție crește (CAMPOS și MARKHAM, 2007).

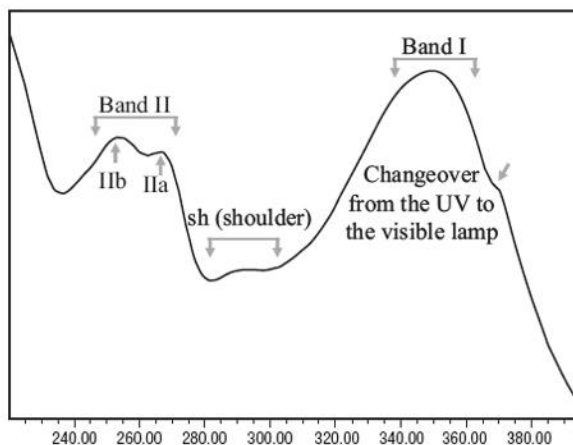
Acidul cafeic este adesea găsit sub forma 3-metil a eterului său, acidul ferulic, în flavonoidele acilate. Spectrul acidului ferulic este foarte similar cu cel al acidului cafeic, dar acidul ferulic poate fi ușor deosebit de acesta prin timpul de retenție mai mare (34.4 min versus 23.5 min).

Flavonele și flavonolii prezintă o absorbție caracteristică în ultraviolet cu două maxime de absorbție, corespunzătoare benzii IIa între 244-285 nm și banda I între 300-400 nm. La banda II se pot evalua într-un mod general, substituțiile care au loc la inelul aromatic B. Cât despre intensitatea benzii I, aceasta se datorează în principal substituțiilor care au loc la C3 de la inelul aromatic C. Banda I este de asemenea afectată atunci când are loc vreo reacție de substituție la inelul A, de exemplu la C6 sau C8 de la acest inel CAMPOS și MARKHAM (2007).

Dacă spectrul ultraviolet are două benzi de absorbție aproape de 250 nm (banda II) și 350nm (banda I), înseamnă că structura principală poate fi o flavonă sau un flavonol. Diferența dintre ele este dată de intensitatea benzii I în comparație cu banda II. Dacă banda I este mai intensă decât banda II, vorbim de o flavonă (la atomul de carbon C3 este legat un atom de H) și invers dacă banda I este mai puțin intensă decât banda II atunci este un flavonol-3-o-substituit (la atomul de carbon C3 este legat un alt radical, în afara de H). Substituienții de la atomul de carbon C3 în acest caz sunt în principal glicozide, dar și acizi fenolici se pot lega aici. În ultimul caz banda I poate fi mai mare decât banda II iar forma va fi similară cu cea a acidului fenolic care s-a legat.

O altă regulă importantă se referă la banda II cuprinsă între 250 – 285 nm. Când la poziția 4'a inelul B al flavonoidelor se leagă un atom de oxigen sau un alt radical cu oxigen, banda II a spectrului apare ca un singur pic (ex. Kaempferolul 3-o-derivat la  $\lambda$  265nm). Apariția unui alt atom de oxigen/sau radical cu oxigen la inelul aromatic B produce o bandă II desfășurată în banda IIa și banda IIb. Aproape întotdeauna una este

mai intensă decât cealaltă, iar cea cu o intensitate mai mică deseori apare sub forma unui „shoulder”. Ex: Banda IIb este mai intensă în cazul derivaților quercetin-3-o-R și luteolinei ( $\lambda=255-267\text{sh}$  și  $\lambda=254-266\text{sh}$ ), iar banda IIa apare doar ca un „shoulder”.



**Fig. 3. – Ilustrarea anumitor caracteristici ale spectrului de absorbție a flavonoidelor, inclusiv denumirea benzilor I, IIa și IIb, exemple de umăr, inclusiv schimbarea de la lampa UV la lumina vizibilă (CAMPOS și MARKHAM, 2007).**

Fig. 3. -Illustration of certain features of the flavonoid absorption spectrum, including the band I, IIa and IIb designation, shoulder examples including the changeover from the UV to visible lamp (CAMPOS și MARKHAM, 2007).

În cazul în care apare situația inversă, banda IIa poate să apară mai intensă, iar „shoulder-ul” apare în partea lungimii de undă a benzii IIb. Această situație apare în cazul unei posibile substituții la carbonul C6 sau C8 al inelului aromatic A sau la carbonul C3' (inelul B). Dacă există o potrivire exactă cu spectrul, dar timpul de retenție (RT= retention time) este diferit, atunci cel mai probabil compusul necunoscut diferă de compusul de referință numai la numărul sau natura zaharurilor legate la situsul de glicozilare sau prin tipul substituției.

## 2.3 Capacitatea antioxidantă a păsturii

### 1.3.3 Antioxidant capacity of bee bread

Activitatea antioxidantă a păsturii este dată de compușii fenolici care au proprietăți redox și care joacă un rol important în captarea radicalilor liberi, inclusiv a radicalilor de oxigen sau peroxid (Nijveldt și colab., 2001). Aceste proprietăți sunt strâns legate de structura chimică a compușilor, în special de numărul de grupări hidroxil legate de nucleul aromatic și de legăturile duble conjugate. În completarea efectului individual, moleculele antioxidante interacționează sinergetic (ZULUAGA și colab., 2014) și astfel se pot proteja reciproc de stresul oxidativ (EREL, 2004). Polifenolii

reprezintă aceea parte a compoziției chimice care variază în funcție de planta de la care este colectat polenul și de perioada anului, fiind o matrice extrem de complexă și neomogenă.

Principala abordare, *in vitro*, pentru evaluarea activității antioxidante a unei probe este determinarea capacității sale de a neutraliza sau de a capta radicalii liberi, deoarece activitățile anti-radicale sunt foarte importante în prevenirea deteriorării alimentelor și a sistemelor biologice (NAGAI și colab., 2005; ZULUAGA și colab., 2015). Extractele obținute din păstură pot fi considerate suplimente funcționale datorită conținutului ridicat de compuși polifenolici și implicit datorită capacității lor de blocare a radicalilor liberi (NAGAI și colab., 2004).

ZULUAGA și colab., (2015) a folosit două metode de evaluare a activității antioxidante a păsturii: TEAC (bazată pe inhibarea radicalului ABTS•) și FRAP (bazată pe reacția radicalului feric). Pentru metoda FRAP valorile obținute au variat între 35.0 și 70.1  $\mu\text{mol Trolox/g}$  păstură și pentru metoda TEAC între 46.1 și 76.2  $\mu\text{mol Trolox/g}$  păstură. Testele au fost realizate comparativ cu polenul de albine, în cazul căruia au fost raportate valori care au variat între 67.0  $\mu\text{mol Trolox/g}$  (FRAP) și 76.2  $\mu\text{mol Trolox/g}$  (TEAC), se poate observa reducerea valorilor în cazul păsturii, coroborând la scăderea activității antioxidante, așa cum s-a constatat și în cazul flavonoidelor.

Studiile existente în literatură de specialitate despre păstura românească sunt extrem de puține. Un astfel de studiu a realizat COCAN și colab., (2009) care a determinat activitatea antioxidantă a extractelor de polen și păstură prin cele trei metode utilizate și în această lucrare, DPPH, FRAP și TEAC. Aceasta a raportat că activitatea antioxidantă a păsturii a variat în funcție de solventul utilizat la extracție, cele mai bune rezultate fiind obținute pentru extractele metanolice prin metoda DPPH și anume 93.35% PI. Cât despre valoarea FRAP cea mai ridicată a fost de 0.404  $\text{mmol Fe}^{II}/\text{g}^{-1}$  pentru extractul metanolic și cea mai scăzută de: 0,196  $\text{mmol Fe}^{II}/\text{g}^{-1}$  pentru extractul apos, iar valoarea TEAC cea mai ridicată s-a înregistrat tot în extractul metanolic și a fost de 0.43 ( $\text{mmol Trolox/g}^{-1}$ ), iar cea mai scăzută 0.14 ( $\text{mmol Trolox/g}^{-1}$ ) în extractul cu apă.

Activitatea antioxidantă a fost măsurată utilizând radicalul DPPH (IVANIȘOVĂ și colab., 2015). Rezultatele au arătat că toate probele de păstură au avut efect antioxidant și cea mai bună valoare obținută a fost de 15,78  $\text{mg TEAC.g}^{-1}$  pentru păstura din Poltava și de 14,62  $\text{mg TEAC.g}^{-1}$  pentru păstura din Vinnica.

Literatura de specialitate furnizează puține informații în ceea ce privește corelarea capacității antioxidante a păsturii cu conținutul de compuși polifenolici și mai ales cu profilul polifenolic specific diferitelor specii florale.

Păstura este o sursă importantă de antioxidanți pentru industria alimentară și farmaceutică. Diferențele observate între activitățile antioxidante ale probelor testate pot fi atribuite prezenței antioxidanților naturali, în principal compușilor fenolici care diferă în funcție de regiunea în care au fost colectate probele (SATI și colab., 2013; TLILI și colab., 2014)

## 2.4 Activitate antimicrobiană

### 1.3.4 Antimicrobial activity

În ultima perioadă în literatură apar din ce în ce mai multe dovezi ale efectului terapeutic, antioxidant și antimicrobian al păsturii și al polenului de albine (CARPES și colab., 2007; MORAIS și colab., 2011, URCAN și colab. 2018).

Un studiu interesant este cel realizat de ABOUDA și colab, (2011) care a testat păstura marocană împotriva a 14 tulpini bacteriene multirezistente, isolate din diverse patologii umane. Acesta a testat efectul antibacterian pe trei tulpini de *E. coli*, o tulpină de *Salmonella enteritis*, trei tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, trei tulpini de *Staphylococcus aureus*, trei tulpini de *Streptococcus* și o tulpină de *Bacillus cereus* prin metoda difuzimetrică. Atât probele de polen cât și cele de păstură au avut efect inhibant, singura diferență fiind în procentul de inhibiție al fiecărei tulpini. Aceste modele de sensibilitate diferite ale tulpinilor sunt datorate compușilor fenolici diferiți din constituția fiecărei probe (ALMEIDA-MURADIAN și colab., 2005). Fiecare tip de polen are specificul său, iar compoziția sa chimică diferă în funcție de originea botanică (NAGAI și colab., 2004).

Efectul antimicrobian al păsturii este atribuit în special substanțelor polifenolice, dar și acizilor grași, aminoacizilor etc. Compușii fenolici pot afecta creșterea și metabolismul bacteriilor, dar ei pot avea fie un un efect inhibitor, fie un efect stimulator, în funcție de concentrația și de tipul de compus fenolic (ESTEVINHO și colab., 2008; Morais și colab., 2011) Mecanismul prin care compușii fenolici inhibă creșterea bacterienă constă în formarea de complexe cu polipeptidele aflate la suprafața peretelui celulei bacteriene prin adeviziune și/sau de enzimele membranei celulare ceea ce duce la distrugerea integrității peretelui, blocarea canalelor ionice și inhibarea fluxului de electroni în lanțul de transport al electronilor care determină sinteza adenozin trifosfatului (ATP) (CUSHNIE și LAMB, 2005).

Potrivit lui DEGRANDI-HOFFMAN și colab., (2015) păstura și polenul conțin compuși cu acțiune bactericidă, precum compușii fenolici și acidul lactic, care au efecte în reducerea creșterii microorganismelor precum mucegaiul și bacteriile patogene. *Lactobacillus* și *Bifidobacterium* inhibă creșterea unor tulpini precum *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* și a unor tulpini gram-negative: *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Klebsiella* și a unei levuri *Candida albicans*. Scăderea valorii pH-ului în timpul conversiei polenului în păstură este atribuită activității bacteriilor lactice prezente în mod natural în polen și în tractul gastrointestinal al albinelor.

Activitatea antimicrobiană a păsturii este demonstrată prin studiile existente în literature de specialitate (ABOUDA și colab., 2011; MARKIEWICZ-ZUKOWSKA și colab., 2013; BALTRUSAITYTE și colab., 2007, IVANIŠOVÁ și colab., 2015, URCAN și colab., 2018)).

**PARTEA A DOUA**  
**SECOND PART**

**CONTRIBUȚIA PERSONALĂ**  
**ORIGINAL RESEARCH**



## **SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI**

### **PURPOSE AND OBJECTIVES OF THE THESIS**

Cercetările realizate în cadrul tezei de doctorat „Evaluarea potențialului bioactiv al păsturii” au avut ca și principal scop elaborarea unui produs funcțional de tip păstură, cu caracteristici similare celui natural, prin valorificarea potențialului fermentescibil al polenului de albine și evidențierea principiilor nutritive și proprietățile biologice ale acestuia înainte și după procesul fermentativ.

Studiile existente în literatura de specialitate care demonstrează proprietățile nutritive și bioactive ale păsturii sunt extrem de puține, motiv pentru care în cadrul acestei teze s-au abordat două direcții de cercetare pentru realizarea scopului stabilit.

Pentru obținerea unui produs tip păstură, cu caracteristici similare celui natural, este necesară, în primul rând, cunoașterea valorii nutritive și a potențialului biologic al păsturii naturale, iar datorită absenței unui standard de calitate pentru acest produs s-a desprins prima direcție de cercetare din cadrul aceste teze care a fost reprezentată de caracterizarea păsturii naturale, prin:

- Cuantificarea compușilor care îi dau valoarea nutritivă;
- Corelarea originii botanice a păsturii cu profilul compușilor biologic activi;
- Studiarea potențialului bioactiv al păsturii, prin determinarea capacității antioxidante și antimicrobiene.

A doua direcție de cercetare a fost reprezentată de exploatarea polenului apicol ca și substrat fermentescibil, pentru fermentația solidă, în vederea obținerii unui produs funcțional tip păstură. Pentru realizarea scopului s-au stabilit următoarele obiective specifice:

- Stabilirea unui protocol de lucru pentru obținerea unui produs tip păstură;
- Studiarea efectului fermentației asupra nutrienților din polen;
- Cuantificarea compușilor biologic activi din polen înainte și după fermentație și corelarea acestora cu originea botanică a polenului;
- Studiarea proprietăților biologice ale polenului prin comparație, înainte și după procesul de fermentație.

### 3. Material și metodică experimentală

### 3. Material and experimental method

#### 3.1 MATERIALUL BIOLÓGIC UTILIZAT

#### 3.1 BIOLOGIC MATERIAL

Pentru realizarea obiectivelor propuse în cadrul acestei lucrări s-au folosit probe de păstură colectate din mai multe județe din România și din Bangalore, India. Probele de polen au fost procurate din județul Cluj și din Coimbra, Portugalia. Probele au fost procurate fie direct de la apicultori, fie din comerț. Până în momentul analizării porbele de păstură a fost păstrate în congelator la temperatura de -18°C pentru a se preveni degradarea lor.

**Tabelul 4/ Table 4**

*Probele de păstură studiate*  
*The analyzed bee bread samples*

Cod probă Sample cod	Tip Type	Proveniență Provenance	Perioada colectării Collection period
P1	Păstură	Jud. Alba	Aprilie 2015
P2	Păstură	Jud. Alba	Martie 2016
P3	Păstură	Jud. Alba*	Aprilie 2016
P4	Păstură	Jud. Alba	Mai 2016
P5	Păstură	Jud. Sălaj	Iunie 2016
P6	Păstură	Jud. Sălaj	Iulie 2016
P7	Păstură	Jud. Cluj	August 2016
P8	Păstură	Bangalore- India*	Iunie 2016
P9	Păstură	Bangalore- India*	Iunie 2016
P10	Păstură	Bangalore- India*	Iunie 2016
P11	Păstură	Jud. Cluj*	Aprilie 2017
P12	Păstură	Jud. Iași	Mai 2017
P13	Păstură	Jud. Iași	Iunie 2017
P14	Păstură	Jud. Botoșani	Iulie 2017
P15	Păstură	Jud. Botoșani	August 2017
P16	Păstură	Jud. Alba	Septembrie 2017
P17	Păstură	Jud. Cluj	Februarie 2017
P18	Păstură	Jud. Bihor	Septembrie 2017
P19	Păstură	Jud. Bihor	Martie 2017
BP1	Polen	Coimbra, Portugalia	Mai, 2017
BP2	Polen	Coimbra, Portugalia	Iunie, 2017
BP3	Polen	Coimbra, Portugalia	Iunie, 2017
BP4	Polen	Jud. Cluj	Iulie, 2017
BP5	Polen	Jud. Cluj	Iulie, 2017

\*Probele sunt cumpărate din comerț, iar originea și perioada de colectare reprezintă declarația vânzătorului



## 3.2 METODE EXPERIMENTALE

### 3.2 EXPERIMENTAL METHODS

Cercetările realizate în cadrul aceste lucrări au fost efectuate:

la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca:

- analizele fizico-chimice au fost efectuate în Laboratorului de Controlul Calității Produselor Apicole (APHIS) din cadrul Institutului de Științele Vieții al USAMV Cluj-Napoca;
- determinarea acizilor grași a fost realizată în cadrul Departamentului de Biochimie al USAMV Cluj-Napoca;
- activitatea antimicrobiană s-a efectuat în Laboratorului de Controlul Calității Produselor Apicole (APHIS) din cadrul Institutului de Științele Vieții al USAMV Cluj-Napoca;

și la Universitatea Coimbra (Universidade de Coimbra), Portugalia:

- determinarea compușilor biologic activi și a activității antioxidante în cadrul laboratorului de Farmacognozie al Facultății de Farmacie, Universitatea Coimbra.

Cercetările s-au realizat utilizând metode consacrate de determinare specifice fiecărui parametru analizat.

#### 3.2.1 Determinarea originii botanice a probelor studiate - analiza palinologică

##### 3.2.1 Botanical origin determination of analyzed samples - palynologic analysis

Originea botanică a polenului de albine care a alcătuit probele de păstură a fost identificată prin metoda descrisă de ALMEIDA-MURADIAN și colab., (2005) și LOUVEAUX și colab., (1978) fără acetoliză adaptată matricii luată în studiu, păstură.

Pentru realizarea preparatului microscopic s-au cântărit 2g din fiecare probă de păstură bine omogenizată peste care s-a adăugat 10ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5%. Probele s-au centrifugat timp de 15 minute la 3900 rotații/minut (1683 rcf) cu o centrifugă Sigma 3-18K. După centrifugare s-a îndepărtat supernatatul, iar peste sedimentul rămas s-a adăugat 5ml apă distilată. S-a agitat energic proba după care a fost centrifugată din nou pentru încă 15 minute. După îndepărtarea supernatantului, cu o pipetă Pasteur s-a colectat întreaga cantitate de sediment și s-a depus pe o lamă de microscop, pe o suprafață de aproximativ 20x20mm. După uscarea completă, sedimentul s-a fixat cu un amestec de gelatină:glicerină:fucsină (SR 784-3:2009) și s-a acoperit cu ajutorul unei lamele de sticlă.

Examinarea microscopică a lamelor cu probele de păstură s-a realizată cu ajutorul unui microscop optic *Olimpus Bx51* cu lumină normală, utilizând obiectivul 40 X pentru identificare și numărare.

Identificarea speciei florale a grauncioarelor de polen din constituția probelor de păstură s-a realizat cu ajutorul preparatelor microscopice de referință din polen floral și a atlaselor de palinologie, urmărindu-se o serie de caracteristici cum ar fi: morfologia, dimensiunile, structura tegumentului, ornamentațiile de pe suprafața exinei, numărul și forma sporilor germinativi. (TARNAVSKI și colab., 1981; TARNAVSKI și colab., 1987; TARNAVSKI și colab., 1990; <http://www.saps.plantsci.cam.ac.uk/pollen/index.htm>; <http://www.geo.arizona.edu/palynology>; <http://pollen.tstebler.ch/MediaWiki>).

### **3.2.2 Analize fizico-chimice pentru determinarea valorii nutritive**

#### **3.2.2 Fizico-chemical for determination of nutritive value**

Caracterizarea probelor de păstură din punct de vedere nutrițional s-a realizat cu ajutorul determinărilor fizic-chimice. În acest sens s-a determinat umiditatea probelor de păstură luate în studiu, conținutul de cenușă, conținutul de glucide, precum și cel de lipide și proteine. Astfel s-a putut calcula conținutul total de carbohidrați și implicit valoare nutrițională a acestui produs apicol.

##### **3.2.2.1 Determinarea umidității**

###### **3.2.2.1 Determination of moisture**

Determinarea conținutului de apă este un parametru extrem de important necesar pentru raportarea ulterioară a rezultatelor la substanța uscată (SU) și s-a realizat prin metoda gravimetrică (uscarea la etuvă la  $103 \pm 2^\circ\text{C}$ ), metodă considerată de referință pentru acest parametru (POPESCU și MEICA, 1997). S-a cântărit 1 g din fiecare probă de păstură pe hârtie de filtru stabilizată în prealabil, după care s-au introdus în etuva (Binder, Germany) setată la  $105^\circ\text{C}$ , timp de 2 ore, urmând ca în final probele să fie păstrate în exicator până la temperatură constantă (aproximativ 30 minute). Procedeu s-a reluat până când diferențele între două cântăriri succesive nu au depășit valoarea de 0.05g. Rezultatele s-au exprimat procentual și reprezintă media a trei determinări independente  $\pm$  deviația standard.

##### **3.2.2.2 Determinarea cenușii**

###### **3.2.2.2 Ash determination**

Determinarea conținutului de cenușă din probele de păstură s-a realizat prin metoda calcinării **A.O.A.C. (1998)**, adaptată la matricea luată în lucru. 1g din fiecare probă de păstură a fost cântărită în creuzete calcinate în prealabil și aduse la masă constantă și au fost introduse în cuptorul de calcinare la temperatura de  $550^\circ\text{C}$  unde au fost menținute timp de 4 ore. Creuzetele cu probe au fost răcite în exicator, iar apoi au fost cântărite. S-au repetat operațiunile de calcinare, răcire și cântărire până la masă constantă. Rezultatele au fost exprimate procentual reprezentând media a trei determinări independente  $\pm$  deviația standard.

### 3.2.2.3 Determinarea conținutului de azot total

#### 3.2.2.3 Determination of total nitrogen content

Determinarea conținutului de proteină din cele 19 probe de păstură s-a realizat prin metoda Kjeldahl. Această metodă constă în determinarea conținutului de azot total din proba de analizat și convertirea lui în echivalent proteină prin multiplicarea cu factorul 6.25 (unei cantități de 6.25 g proteină îi corespunde 1g azot) (POPESCU și MEICA, 1997; LUJERDEAN și VARGA, 2002).

În studiul de față pentru determinarea conținutului de proteină din probele de păstură s-a cântărit câte 1g din fiecare probă direct în containere speciale de cântărire care au fost introduse în fiolele sistemului de digestie (Buchi Digestion Unit K-424 cuplat cu Buchi Scrubber B-414, Fig. 8), peste care s-a adăugat 25ml  $H_2SO_4$  concentrat 95-97% și tabletele Kjeldahl, digestia (mineralizarea) durată aproximativ 2h.

Distilarea s-a efectuat cu o unitate de distilare Büchi, KjelFlex K-360. La fiecare determinare s-au utilizat 50ml  $H_2O$ : 90ml NaOH: 60 ml  $H_3BO_3$  (de pH 4.65).

Titrarea la pH 4.65 s-a realizat cu ajutorul unui titrator automat, TitroLine easy (Schott), utilizându-se acid sulfuric de concentrație 0.5N.

Rezultatele au fost exprimate procentual ca media a trei determinări independente  $\pm$  deviația standard.

### 3.2.2.4 Determinarea conținutului de lipide totale

#### 3.2.2.4 Determination of total lipid content

Lipidele totale (LT) din probele de păstură studiate au fost extrase după metoda propusă de **FOLCH și colab. (1951)**, utilizând un amestec de cloroform/metanol: 2/1(v/v). S-a ales această metodă de extracție (la rece), în defavoarea extracției Soxhlet, deoarece s-a dorit utilizarea extractului lipidic pentru analiza acizilor.

5g din probă de analizat a fost omogenizată cu un amestec de cloroform:metanol (2/1, v/v), timp de 30 de minute. Amestecul s-a filtrat, iar reziduul solid s-a resuspendat în cloroform:metanol și s-a omogenizat din nou timp de 30 de minute după care a fost filtrat. Filtratele reunite au fost spălate cu o soluție de KCl 0,88% și metanol:apă (1:1, v/v). Stratul lipic purificat a fost colectat într-un balon cotat, iar solventul s-a îndepărtat cu ajutorul unui evaporator rotativ Büchi. Determinarea procentului de lipide totale s-a realizat gravimetric. Rezultatele în ceea ce privește cantitatea de lipide totale reprezintă media a trei determinări independente  $\pm$  deviația standard și au fost exprimate în g lipide / 100g probă.

Fracțiunile lipidice astfel obținute au fost transferate în flacoane cu 2 ml cloroform, formând soluția stoc și s-au păstrat la  $-18^\circ C$  pentru analizele ulterioare (determinările acizilor grași).

### 3.2.2.5 Determinarea conținutului de glucide libere

#### 3.2.2.5 Determination of free sugars content

Conținutul de glucide libere din păstură s-a analizat prin metoda HPLC-IR descrisă de IHC (1997) și adaptată de BONTA și colab., (2008) pentru matricea luată în studiu, păstura.

O cantitate de 2,5 g de păstură macinată în prealabil s-a dizolvat în apă ultrapură. Amestecul a fost transferat într-un balon cotate de 50 ml care conține 12.5 ml metanol de puritate HPLC. Conținutul se aduce la semn cu apă ultrapură, apoi se filtrează printr-un filtru de nylon de 0.45μm și se injectează în sistemul HPLC.

Separarea, identificarea și cuantificarea compușilor glucidici s-a realizat cu ajutorul sistemului HPLC - IR Shimadzu VP echipat cu pompă LC – 10AD, degazor DGU – 14A, sistem de control SLC 10A, sistem de injecție automată SIL – 10 AD și detector cu indice de refracție RID – 10A, iar datele au fost procesate cu ajutorul soft-ului LC Solution. Separarea cromatografică a glucidelor s-a realizat pe o coloană de oțel inoxidabil modificată Altima Amino 100Å, cu lungimea de 250mm și diametrul de 4.6mm (Alltech), cu dimensiunea particulelor de 5 μm. Temperatura în interiorul coloanei a fost menținută la 30°C cu ajutorul unui cuptor de termostatare CTO – 10 AS. Presiunea pe coloană a fost de 6.3 MPa. Amestecul de acetonitril/apă (75/25; v/v) (filtrată printr-un filtru Millipore cu dimensiunea porilor de 0,45μm) a fost utilizat ca și fază mobilă. Volumul de injecție a fost de 10μl, iar debitul de 1,3 ml/min.

Identificarea și cuantificarea spectrului glucidic al probelor de păstură s-a realizat cu ajutorul unui amestec de standarde de glucide (Fig. 4).

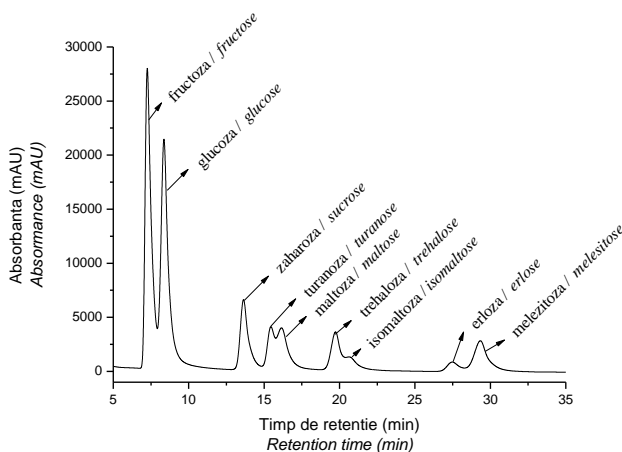


Fig. 4. Cromatograma amestecului de 9 standarde de glucide

*Fig.4. Chromatogram of the 9 standard mixture of sugars*

### 3.2.2.6 Determinarea valorii nutritive

#### 3.2.2.6 Determination of nutritive value

Pentru a calcula valoarea energetică a păsturii este necesar să se cunoască cantitatea de carbohidrați.

Cantitatea totală de carbohidrați se poate estima folosind expresia:

$$\text{Carbohidrați totali} = 100 - (\text{cenușă} + \text{proteină} + \text{lipide}).$$

Valoarea energetică a probelor de păstură a fost calculată conform următoarei ecuații:

$$\text{Valoarea energetică (kcal)} = 4.1 \times (\text{g proteină} + \text{g carbohidrați}) + 9.3 \times (\text{g lipide})$$

(MERRILL și WATT, 1955; CAMPOS și colab., 2008)

### 3.2.2.7 Determinarea pH-ului și a acidității libere

#### 3.2.2.7 Determination of pH and free acidity

Pentru determinarea acidității libere se neutralizează acizii liberi din proba de analizat cu o soluție de NaOH 0.05M până la punctul de echivalență al pH-ului. S-a utilizat metoda descrisă în A.O.A.C. 920.43, adaptată pentru matricia luată în lucru.

Se cântăresc 5 g de probă și se omogenizează cu 40 ml apă ultrapură. După omogenizare se trece soluția într-un balon cotat de 50 ml și se aduce la semn cu apă ultrapură. Se omogenizează proba după care cu o pipetă se iau 25 ml din probă și se pun într-un pahar Berzelius în care se introduce electrodul de pH al titratorului automat TitroLine easy (Schott). Se citește valoare pH-ului inițial înainte de a începe titrarea cu NaOH 0.05M. Când se ajunge la pH-ul de echivalență titrarea se oprește și se notează volumul de NaOH folosit la titrare (V).

### 3.2.3 Metode de determinare a compușilor biologic activi

#### 3.2.3 Methods for biologically active compounds determination

Metodele utilizate în cadrul acestei lucrări pentru determinarea compușilor biologic activi au fost cele cromatografice și spectrofotometrice.

### 3.2.3.1 Determinarea conținutului de aminoacizi liberi

#### 3.2.3.1 Determination of free amino acid content

Profilul aminoacizilor liberi s-a determinat prin tehnica cromatografiei lichide cuplată cu detector de masă (LC-MS). Determinările au fost realizate pe un sistem cromatografic Shimadzu 2010 EV (Kyoto, Japonia) este echipat cu: pompă cuaternară LC-20 AD, cuptor pentru coloană CTO-20 AC, degazor DGV-20 A5, injector automat SIL-20 AC cu sistem de răcire și auto sampler cu 70 de poziții, generator de azot LC-MS1 și 2 detectori, unul cu rețea de fotodiode SPD-M-20A și alt spectrometru de masă LC-MS 2010 EV cu interfață electrospray.

Parametrii operaționali ai metodei au fost:

- faza staționară - coloana cromatografică EZ: faast AAA-MS, 250x3.0 mm,

- faza mobilă: format de amoniu 10mM în apă(A) și format de amoniu 10mM în metanol(B),

Debitul a fost de 0,3 ml/min, temperatura pe coloană de 35°C, volum de injecție a fost de 1μL, tensiune detector: 1.7KV, timp de achiziție: 33 min.

0.25g probă s-a dizolvat în 10ml apă ultrapură, apoi s-a sonicat timp de 30 de minute și s-au centrifugat 10 minute la 10000 rpm. Din supernatant s-au luat 25μl și s-a urmat procedura descrisă în kit-ul EZ: fast Phenomenex, procedură care cuprinde 3 etape: extracția în fază solidă, derivatizarea și extracția lichid-lichid. Identificarea și cuantificarea aminoacizilor s-a realizat prin metoda standardului intern. Rezultatul final va fi exprimat în mg/100g probă studiată, reprezentând valorile concentrațiilor de aminoacizi liberi.

### 3.2.3.2 Determinarea acizilor grași

#### 3.2.3.2 Fatty acids determination

Profilul acizilor grași din probele de păstură a fost identificat prin metoda de analiză gaz-cromatografică cuplat cu spectrometrie de masă GS-MS.

Esterii metilici ai acizilor grași (EMAG/*FAME*) au fost obținuți după metoda descrisă de **CHRISTIE (1989)** din lipidele totale, utilizându-se proceduri de transesterificare în cataliză acidă. *FAME* au fost determinați cu ajutorul unui GS-MS (gaz cromatograf cuplat cu spectrometrul de masă) PerkinElmer Clarus 600 T (PerkinElmer, Inc, Shelton, U.S.A.), echipat cu o coloană capilară SUPELCOWAX 10 (60m × 0,25mm i.d., grosimea filmului de 0,25 μm; Supelco Inc, Bellefonte, PA). Temperatura injectorului a fost stabilită la 210°C. Programul de temperatură pentru coloană a fost: temperatură inițială de 140°C, creștere cu 7°C / min până la 220°C unde a fost păstrată timp de 23 min. Viteza de curgere a gazului purtător (heliu) a fost de 0,8 ml/min și rația de splitare de 1:24. Volumul probei a fost de 0,5μl. S-a utilizat sursă cu impact de electroni modul pozitiv (EI), spectrele de masă înregistrându-se la o energie de ionizare de 70 eV și un curent de captare de 100 μA, cu o temperatură a sursei de 150°C. Scanările de masă au fost efectuate în intervalul de m/z : 22-395 la o rată de 0,14 scanare/s cu un timp intermediar de 0,02s între scanări.

Identificarea *FAME* a fost realizat prin compararea timpilor lor de retenție cu cele ale standardelor cunoscute (s-a utilizat un mix *FAME* cu 36 compuși, Supelco # 47885 - U) și cu spectrele de masă din librăria de spectre NIST MS Search 2.0.

Analiza cantitativă a acizilor grași se realizează prin integrarea picurilor și calculul ariilor acestora, exprimate ca procent din totalul picurilor. Acest procent este proporțional cu ponderea fiecărei acid gras în amestec. Pentru a exprima în valori absolute cantitatea fiecărui acid gras din amestec, este necesar să se determine concentrația totală a substanțelor în amestec, iar mai apoi pe baza procentelor deduse din cromatograme se calculează concentrația fiecărei componente (SOCACIU, 2000).

Cantitatea de acizi grași a fost exprimată ca procent din cantitatea de lipidele totale.

### **3.2.3.3 Prepararea extractelor în vederea analizelor spectrofotometrice**

#### **3.2.3.3 Preparation of extracts for UV-VIS spectrophotometric analysis**

Pentru realizarea extractelor s-au macinat și omogenizat probele, după care s-a trecut la cântărirea unei cantități de 1 g din fiecare probă. Probele au fost extrase individual cu 5 ml de solvent (metanol:apă, 80:20). Amestecul a fost omogenizat cu un omogenizator Polytron-Kinematica, în baie de gheață timp de 5 minute, după care a fost sonicat într-o baie cu ultrasunete Bandelin, timp de 15 minute. Extractul rezultat, a fost centrifugat la 3500 rpm, timp de 20 de minute, la temperatura de 4°C.

Supernatantul a fost îndepărtat și colectat în tuburi Eppendorf și a fost păstrat în congelator la -18°C până în momentul efectuării analizelor spectrofotometrice.

### **3.2.3.4 Determinarea conținutului de polifenoli totali**

#### **3.2.3.4 Determination of total polyphenolic content**

Conținutul de polifenoli totali a fost analizat prin metoda spectrofotometrică Folin-Ciocalteu adaptată de către ATTARD (2013).

Un volum de 100 μl de reactiv Folin-Ciocalteu (0,2N) s-a adăugat la 10μl de extract de păstură. După 5 minute s-a adăugat 80 μl soluție de carbonat de sodiu ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 1M), amestecul obținut fiind păstrat la temperatura camerei la întuneric timp de 20 de minute. După cele 20 de minute s-a măsurat absorbanta probelor la lungimea de undă de 760 nm. S-a folosit ca și martor amestecul conținând metanol, reactiv Folin-Ciocalteu și soluție de carbonat de sodiu.

Cuantificarea polifenolilor totali din extractele de păstură s-a realizat pe baza unei curbe de calibrare construită folosind ca și standard de referință acidul galic.

Pentru realizarea curbei de calibrare s-a preparat o soluție stoc de acid galic (1mg/ml) din care s-au realizat diluții în intervalul 0,25-300 μg/ml, iar absorbanțele acestora au fost citite la 760 nm urmând același protocol.

Rezultatele au fost exprimate ca și media a trei determinări în funcție de acidul galic folosit ca pentru trasarea curbei de calibrare. Rezultatele au fost exprimate în mg echivalenți de acid galic (mgGAE/g păstură).

### **3.2.3.5 Determinarea conținutului de flavonoide totale**

#### **3.2.3.5 Determination of total flavonoid content**

Conținutul de flavonoide totale s-a determinat prin metoda spectrofotometrică preluată din literatura de specialitate (MĂRGHITAȘ și colab., 2009; DEZMIREAN și colab., 2017) care folosește ca și reactiv specific clorura de aluminiu.

Înainte de efectuarea analizei propriu-zise, fracțiunea flavonoidică a fost purificată prin extracție lichid-lichid cu acetat de etil. Pe scurt, s-a evaporat alcoolul din fiecare probă, iar partea apoasă a probei a fost spălată cu acetat de etil (1:1) de trei ori. După spălare probele au fost aduse la sec, iar reziduul rezultat a fost redizolvat în metanol în vederea cuantificării.

Un volum de exact 25µl extrct de păstură se adaugă la 100µl apă ultra pură şi la 10µl de nitrit de sodiu ( $\text{NaNO}_2$ ) 5%. După exact 5 minute se adaugă 15 µl clorură de aluminiu ( $\text{AlCl}_3$ ) 10%, după alte 5 minute se adaugă 50 µl hidroxid de sodiu ( $\text{NaOH}$ ) 1M în fiecare godeu al plăcii şi încă 50µl apă ultrapură. Absorbția amestecului obținut se citește la lungimea de undă de 510 nm. În godeurile în care s-a realizat blancul, volumul de probă a fost înlocuit cu metanol, iar clorura de aluminiu a lipsit, restul protocolului fiind identic.

Pentru cuantificarea cantităților de flavonoide totale din extractele de păstură, s-a trasat o curba de calibrare utilizând ca şi compus de referință quercetina. S-a pregătit în prealabil o soluție stoc de quercetină de concentrație 1 mg/ml, din care s-au preparat diluții în intervalul de concentrații 0,25 µg/ml – 300 µg/ml.

Rezultatele au fost exprimate în mg echivalenți de quercetină, (mgQE/g păstură) reprezentând media a trei determinări independente.

### **3.2.3.6 Pregătirea extractelor în vederea analizei HPLC/DAD**

#### **3.2.3.6 Preparation extracts for HPLC/DAD**

Pentru extracția fracțiunilor polifenolice din probele de păstură luate în lucru, s-a folosit metoda de extracție dezvoltată de CAMPOS şi colab., (1997), cu mici modificări. Mai exact, s-a utilizat tehnica de extracție solid-lichid cu ajutorul unui amestec etanol:apă 1:1 (v/v).

O cantitate de 10 mg de păstură a fost amestecată cu 1 ml de amestec etanol:apă 1:1 (v/v). Amestecul a fost sonicat timp de o oră, utilizând o baie cu ultrasunete Bendelin. Extractul rezultat, a fost mai apoi centrifugat la 3600 rotații/minut, timp de 5 minute. După centrifugare s-a colectat supernatantul, iar sedimentul a fost re-extras, procedându-se în acelaşi mod. Supernatanții au fost apoi reuniți, rezultând extractul final. Extractele astfel obținute au fost pastrate la frigider la 4 °C până în momentul efectuării analizei HPLC. Înainte de injectarea probei în sistemul cromatografic, extractul s-a filtrat prin filtru milipore 45 µm.

### **3.2.3.7 Analiza HPLC- DAD a flavonoidelor şi a acizilor fenolici**

#### **3.2.3.7 HPLC-DAD analysis of flavonoids and phenolic acids**

Analiza compușilor polifenolici din probele de păstură s-a realizat prin HPLC-DAD cu ajutorul unui sistem Gillson echipat cu un degazor, 2 pompe modelul 305 şi 306, un detector cu şir de diode DAD Waters 996, controlerul de sistem Waters 600E şi un integrator Spectra Physics 4290. Separarea flavonoidelor s-a realizat cu ajutorul unei coloane Hibar Lichrosorb 100  $\text{RP}_{18}$  5mm (11.19 X 0.4 cm), dimensiunea particulelor 5µm. Aceasta a fost menționată la 25 °C cu ajutorul unui cuptor de termostatare.

Pentru eluarea compușilor fazele mobile utilizate au constat în apă ultra pură acidifiată cu acid ortofosforic (pH=2.3) – faza (A) şi acetonitril – faza (B). Debitul de eluare a fost de 0.8 ml/minut. Pentru determinarea flavonoidelor şi a acizilor fenolici



din extractele de păstură s-a utilizat un volum de injecție de 20  $\mu$ l. Un detector UV-VIS, asigură detectarea compușilor polifenolici.

Identificarea picurilor din cromatogramele obținute s-a realizat pe baza similitudinii spectrelor UV înregistrate cu spectrele compușilor de referință (standardele) din profilotecă și prin comparație cu spectrele prezentate de către CAMPOS și MARKHAM (2007). De asemenea, pe lângă compararea spectrelor obținute, s-a comparat și timpul de retenție (RT) al fiecărui compus în parte.

Determinarea cantitativă s-a realizat apelând la standarde de quercetină pentru aglucone, quercetină -3-*O*-*L*-rutinozid (rutină) și kampferolul-3-*O*-glicozidic pentru flavonoidele glucosidate. Dozarea derivaților acidului cafeic s-a realizat cu ajutorul acidului cafeic ca și standard de referință. S-au realizat soluții stoc pentru fiecare standard de 1mg/ml din care s-au preparat diluții pentru realizarea curbelor de calibrare. Standardele au fost injectate în triplicat. Volumul de injecție a fost de 20  $\mu$ l pentru fiecare diluție. Curbele de calibrare au fost realizate prin plotarea ariei picurilor și a concentrației corespunzătoare fiecărei diluții.

### **3.2.4 Metode de determinare a activității antioxidante**

#### **3.2.4 Determination of antioxidant capacity**

Activitatea antioxidantă reprezintă una dintre cele mai importante etape care se realizează atunci când se dorește evaluarea activității biologice a unei matrici. Determinarea activității antioxidante constă în reacția dintre un radical liber (ex. DPPH sau  $\text{Fe}^{2+}$ ) și matricea luată în studiu. Rezultatul reacției este evaluat spectrofotometric și reprezintă cantitatea de radical liber care s-a stabilizat în prezența compușilor biologic activi din matricea de interes.

#### **3.2.4.1 Determinarea capacității de captare a radicalului liber DPPH**

##### **3.2.4.1 DPPH radical scavenging capacity**

Capacitatea de captare a radicalului liber DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) s-a realizat prin metoda spectrofotometrică a lui VELAZQUEZ și colab., 2003.

Principiul metodei constă în reducerea radicalului liber 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), la 2,2-difenil-1-picrilhidrazină în prezența unui antioxidant. Reacția de redox este însoțită de decolorarea soluției DPPH, pe măsură ce reacția evoluează, cu o remanență de culoare galben deschis (MOLYNEUX 2004).

Un volum exact de 40 $\mu$ l de extract metanolic de păstură a fost pipetat peste 200  $\mu$ l soluție metanolică de DPPH (0,2 mg/ml). Amestecul a fost lăsat să reacționeze 15 minute la întuneric, microplaca fiind introdusă în interiorul spectrofotometrului multicanal. La minutul 15 s-a citit absorbanta la 517 nm. Martorul utilizat a constatat într-un amestec de metanol și soluție metanolică de DPPH.

Pentru evaluarea capacității de blocare a radicalului liber DPPH s-a folosit ca și compus standard de referință Trolox-ul (acid 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-

carboxilic), analogul hidrosolubil al vitaminei E. Din soluție stoc de 1mM/L Trolox s-au realizat diluții succesive în intervalul 0,1-0,01mM utilizate în vederea construirii curbei de calibrare. Acestea au fost analizate respectând același protocol de lucru. Cu ajutorul curbei de calibrare s-au determinat mai apoi concentrațiile echivalente de Trolox ale fiecărei probe analizate.

### **3.2.4.2 Determinarea activității antioxidante prin metoda TEAC**

#### **3.2.4.2 ABTS radical scavenging capacity (TEAC method)**

Metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity assay) utilizată este cea îmbunătățită (RE și colab., 1999). Metoda se bazează pe abilitatea antioxidantului testat de a capta radicalul cationic al ABTS (2,2-azino-bis(3-etil-benzo-tiazolin-6-sulfonat) format (ABTS<sup>•+</sup>) și este însoțită de decolorarea soluției de culoare verde închis a radicalului ABTS<sup>•+</sup>. Scăderea concentrației radicalului în mediul de reacție, datorită acțiunii unui antioxidant, este însoțită de scăderea semnalului înregistrat spectrofotometric (absorbanta) la 734nm. Decolorarea radicalului permite cuantificarea concentrației de antioxidantului din proba analizată, pe baza răspunsului obținut pentru concentrații cunoscute dintr-un compus de referință standard.

Un volum de 170 μl din reactivul ABTS s-a adăugat peste 10 μl extract de păstură. După exact 5 minute s-a făcut citirea absorbanței la 734 nm. Pentru martor s-a înlocuit volumul probei cu un volum echivalent de metanol, restul metodei fiind același.

Pentru cuantificarea capacității antioxidante a probelor analizate, s-a trasat o curba de calibrare cu Trolox. Pentru realizarea curbei s-a pregătit o soluție stoc de trolox, de concentrație 1mM și s-au preparat diluții în intervalul 0.08-0.5 mM. Curba de calibrare a fost realizată respectând protocolul mai sus menționat.

Rezultatele, privind capacitatea antioxidantă a păsturii, s-au exprimat în mmoli echivalenți trolox, cunoscută în literatură ca și valoarea TEAC (mmol Trolox/g păstură).

### **3.2.4.2 Determinarea potențialului antioxidant prin metoda FRAP**

#### **3.2.4.2 Ferric reducing antioxidant potential (FRAP method)**

Evaluarea potențialului antioxidant total (FRAP) s-a realizat utilizând metoda descrisă de (BENZIE și STRAIN, 1996) cu adaptările impuse de matricea luată în studiu.

În prezența unui potențial antioxidant în proba analizată are loc reducerea ionului feric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) la ionul feros ( $\text{Fe}^{2+}$ ), acesta din urmă formând un complex colorat în albastru cu reactivul TPTZ (2,4,6 – tripiridil-s-triazină), fapt care duce la creșterea absorbantei.

Pentru efectuarea determinărilor s-au utilizat 300 μl reactiv FRAP și 10 μl extract metanolic de păstură și 10 μl de apă ultrapură. Microplaca a fost termostatăă la temperatura de 37 °C, iar absorbanta a fost citită la momentul inițial (momentul 0) și la exact 20 de minute după termostatare, la o lungime de undă de 593nm. Citirile realizate la minutul 0 și la minutul 20 reprezintă absorbanta de la începutul și de la sfârșitul reacției. Stabilirea timpului de reacție (20 de minute) s-a bazat pe realizarea curbei

cinetice a reacției. Controlul negativ a fost reprezentat de utilizarea apei ultra pure în locul probelor și a fost analizat în aceleași mod.

Pentru calcul s-a construit o curba de calibrare cu ajutorul unei soluții stoc de sulfat feros ( $\text{FeSO}_4$ ) de 1mmol/l din care s-au preparat diluții succesive în intervalul 0,1-1mM/l.

Rezultatele obținute privind potențialul antioxidant total al probelor de păstură sunt media a trei determinări independente și au fost exprimate în mmol  $\text{Fe}^{2+}$ / g probă.

### **3.2.5 Determinarea activității antimicrobiene**

#### **3.2.5 Antimicrobial activity of bee bread**

##### **3.2.5.1 Prepararea extractelor în vederea determinării activității antimicrobiene**

###### **3.2.5.1 Preparation of bee bread extracts for antimicrobial activity**

În vederea testării activității antimicrobiene a probelor de păstură s-au realizat extracte în apă. S-a ales apa ca și solvent și nu alcoolul (metanol sau etanol) pentru a nu influența capacitatea de inhibare a dezvoltării microorganismelor (VEZETEU și colab., 2017).

S-au cântărit 2 g de păstură măcinată în prealabil și bine omogenizată peste care s-a adăugat 2 ml apă distilată, amestecul a fost agitat, după care a fost pus la sonicat timp de 1h. Extractele apoase obținute au fost centrifugate timp de 20 de minute la 4000 rpm. După centrifugarea probelor, supernatanții au fost colectați cu grija în tuburi Eppendorf. Extractele obținute au fost diluate după cum urmează 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 pentru a identifica concentrația minimă inhibitorie.

Extractele pregătite după metoda descrisă mai sus au fost realizate tot timpul în aceeași zi cu realizarea analizei în vederea determinării activității antimicrobiene.

##### **3.2.5.2 Tulpinile bacteriene utilizate și cultivarea lor**

###### **3.2.5.2 Bacterial strains and their cultivation**

Activitatea antibacteriană a păsturii s-a testat pe 9 tulpini bacteriene: 6 tulpini de bacterii gram pozitive: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus laterosporus*, *Paenibacillus larvae*, *Paenibacillus alvei*, *Enterococcus faecalis* și 3 tulpini de bacterii gram negative *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Salmonella enteritidis*. Tulpinile pe care s-a testat efectul antibacterian au provenit din colecția de tulpini a laboratorului de Microbiologie a Facultății de Zootehnie și Biotehnologii și din cea a Laboratorului de Controlul Calității Produselor Apicole din cadrul Facultății de Zootehnie și Biotehnologii din Cluj-Napoca.

Selecția tulpinilor s-a realizat în funcție de datele din literatura de specialitate și s-a dorit ca acestea să acopere atât tulpini patogene pentru om cât și tulpini patogene pentru albine. (ABOUDA și colab., 2011; CARPES și colab., 2007; GRAIKOU și colab., 2011; MORAIS și colab., 2011; PASCOAL și colab., 2014).

Toate tulpinile bacteriene utilizate, provenite din culturi stocate la  $-80^{\circ}\text{C}$ , au fost cultivate mai întâi pe plăci cu agar nutritiv sau pe plăci cu medii speciale (Merck, Germany), la  $37^{\circ}\text{C}$  timp de 24 de ore. De pe fiecare placă cu culturi bacteriene astfel obținute s-a ales o singură colonie pentru a servi drept inocul la realizarea culturilor bacteriene, pe mediu lichid, care vor fi utilizate în cadrul experimentului pentru testarea efectului antibacterian al extractelor de păstură. După însămânțare, culturile bacteriene pe mediu lichid, au fost incubate 24 de ore, la  $37^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.5.3 Testarea activității antimicrobiene și identificarea concentrației minime inhibitorii**

#### **3.2.5.3 Antimicrobial activity assay and identification of minimum inhibitory concentration**

În realizarea testului de evidențiere a activității antibacteriene a probelor de păstură este necesară utilizarea unor culturi bacteriene de 24 ore pe mediu lichid (bulion nutritiv). Determinarea capacității antimicrobiene și a concentrației minime inhibitorie a extractelor de păstură s-a realizat conform protocolului descris de ERLER și colab., (2016), în microplăci cu 96 de godeuri, cu ajutorul spectrofotometrului cu multidetecție BioTek Synergy 2.

Pe scurt, s-a introdus în fiecare godeu al plăcii 100  $\mu\text{l}$  de bulion nutritiv steril peste care s-au adăugat 100  $\mu\text{l}$  din fiecare dintre extractele de păstură. În godeurile astfel pregătite s-a pipetat 10  $\mu\text{l}$  suspensie bacteriană cu densitatea de 0.5 pe scara McFarland. Controlul pozitiv (200  $\mu\text{l}$ ) a fost reprezentat de mediu de cultură plus suspensie bacteriană (10  $\mu\text{l}$ ), iar ca și control negativ s-a utilizat solventul utilizat la extracția principiilor active din păstură (apa). După însămânțare, microplăcile au fost termostatate cu capacul închis la temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , iar citirea absorbanței s-a realizat la fiecare 15 minute timp de 24 de ore. Lungimea de undă la care a fost citită densitatea optică a fost de 600 nm.

### **3.2.6 Protocolul pentru obținerea unui produs tip păstură artificială**

#### **3.2.6 Protocol for obtaining artificial bee bread type**

Pe scurt, pentru obținerea păsturii în condiții de laborator s-a utilizat polenul de albine proaspăt care a fost supus fermentației solide. S-a folosit păstură proaspăt extrasă din celulele fagurilor ca și inocul natural pentru fermentația polenului. Au fost realizate cinci încercări cu cinci tipuri de polen poliflor, în triplicat. Fiecare probă de polen (30 g) a fost pusă într-un vas steril și a fost amestecat cu 5% inocul (păstură proaspăt extrasă din celulele fagurilor). După ce s-a omogenizat foarte bine amestecul, s-a presat în vasul steril, iar deasupra s-a adăugat un strat subțire de miere pentru a evita oxidarea și fermentațiile aerobe putrefactive, dar și pentru a simula modul de depozitare al polenului în stup. Proba martor pentru acest studiu o reprezintă polenul. Probele astfel pregătite au fost puse într-un incubator la temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , timp de 21 de zile.

S-a încercat reproducerea cât mai fidelă a condițiilor naturale din stup și din acest motiv nu s-au utilizat alți aditivi pentru producerea fermentației. S-a ales varianta cu 5% inocul de păstură naturală după ce în prealabil au fost testate și alte variante (10%, 15% și 20% inocul de păstură), iar rezultatele au fost identice indiferent de procentul de inocul adăugat. S-a ales perioada de 21 de zile pentru a avea certitudinea că procesul de fermentație a avut loc și pentru a observa dacă acest proces se oprește și valoarea pH-ului și a acidității rămâne constantă.

### **3.3 Interpretarea statistică a rezultatelor**

#### **3.3 Statistical analysis of results**

Toate determinările au fost realizate în serii de trei repetiții independente, rezultatele obținute fiind prezentate ca și media  $\pm$  abaterea standard (SD).

Analiza statistică a rezultatelor, în vederea validării rezultatelor, s-a realizat prin metode statistice care se pretează modului de organizare a experiențelor și de distribuția normală a rezultatelor.

Analiza statistică s-a realizat cu ajutorul software-ului GraphPad Prism 6. Pentru analiza varianței dintre valorile obținute s-a utilizat testul comparațiilor multiple ANOVA (one-way ANOVA) compararea mediilor realizându-se pe baza diferențelor semnificative pentru  $p < 0.05$ .

Pentru analiza valorilor obținute în cazul polenului și al polenului fermentat s-a utilizat testul t (Unpaired t test), pentru compararea mediilor a două eșantioane independente. Intervalul de încredere a fost de 95%, iar  $p < 0.05$ .

Analiza corelațiilor dintre de variație corespunzătoare fiecărui caracter determinat s-a realizat prin metoda regresiei liniare, iar pe baza coeficienților de corelație calculați ( $R^2$ ) s-a putut stabili gradul de independență dintre pH și aciditate. Prelucrarea datelor prin această metodă statistică s-a realizat cu ajutorul Microsoft Excel 2016.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

## RESULTS AND DISCUSSIONS

### 4. REZULTATE ȘI DISCUȚII PRIVIND PROBELE DE PĂSTURĂ

### 4. RESULTS AND DISCUSSIONS REGARDING BEE BREAD SAMPLES

#### 4.1 Rezultate și discuții privind analiza palinologică

#### 4.1 Results and discussions regarding the palynological analysis

Probele de păstură studiate se prezintă sub forma unui amestec de polen, extras din celulele fagurilor unde a suferit un proces de fermentație lactică. Fiecare pelet de polen de albine din păstură provine în general de la una sau mai multe specii florale. Procesul de fermentație, în unele cazuri modifică forma grăunciorului de polen. Aceste aspecte îngreunează procesul de identificarea a originii botanice a păsturii, deoarece la analiza palinologică se urmăresc caracteristici precum: morfologia grăunciorului, dimensiunile, structura tegumentului, ornamentațiile de pe suprafața exinei, numărul și forma porilor germinativi. Aceste însușiri sunt specifice fiecărei specii florale în parte.

(TARNAVSCHI și colab., 1981; TARNAVSCHI și colab., 1987; TARNAVSCHI și colab., 1990; <http://www.saps.plantsci.cam.ac.uk/pollen/index.htm>, <http://www.geo.arizona.edu/palynology>; <http://pollen.tstebler.ch/MediaWiki>).

Imaginile fotografice ale preparatelor microscopice corespunzătoare probelor de păstură studiate au fost realizate cu o camera UC30 și prelucrate cu un soft Olympus Stream Basic și sunt prezentate în figura 5, 6 și 7.

Imaginile obținute au fost comparate cu preparate microscopice de referință din polen floral (realizate după metoda descrisă mai sus) și cu fotografii din atlasele de palinologie. Datorită absenței literaturii de specialitate în ceea ce privește analiza palinologică a păsturii, imaginile obținute au fost comparate cu studii care prezintă analiza palinologică a polenului de albine

În tabelul 5 sunt prezentate familiile și speciile cărora aparțin probele analizate. Acestea sunt grupate conform metodei prezentate de **LOUVEAUX și colab., 1978** după cum urmează:

- polen predominant (>45%);
- polen secundar (16-45%);
- polen important minor (3-15%);
- polen minor (<3%).

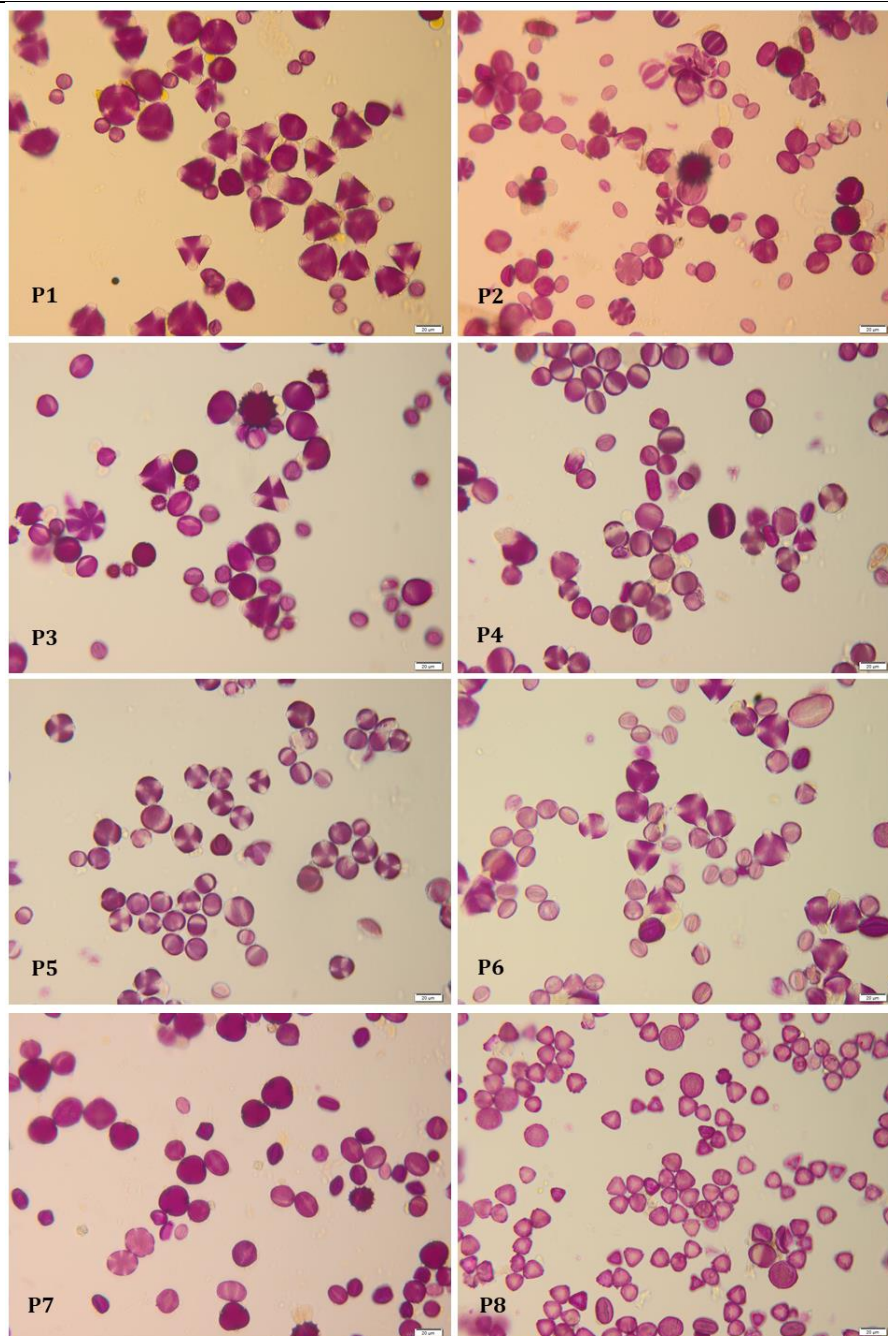


Fig. 5. Imaginea microscopică a grăunțelor de polen specifice probelor de păstură P1-P19 studiate (imagini originale)

*Fig. 5. Microscopic images of specific pollen grains of bee bread samples P1-P19 analysed (original images)*

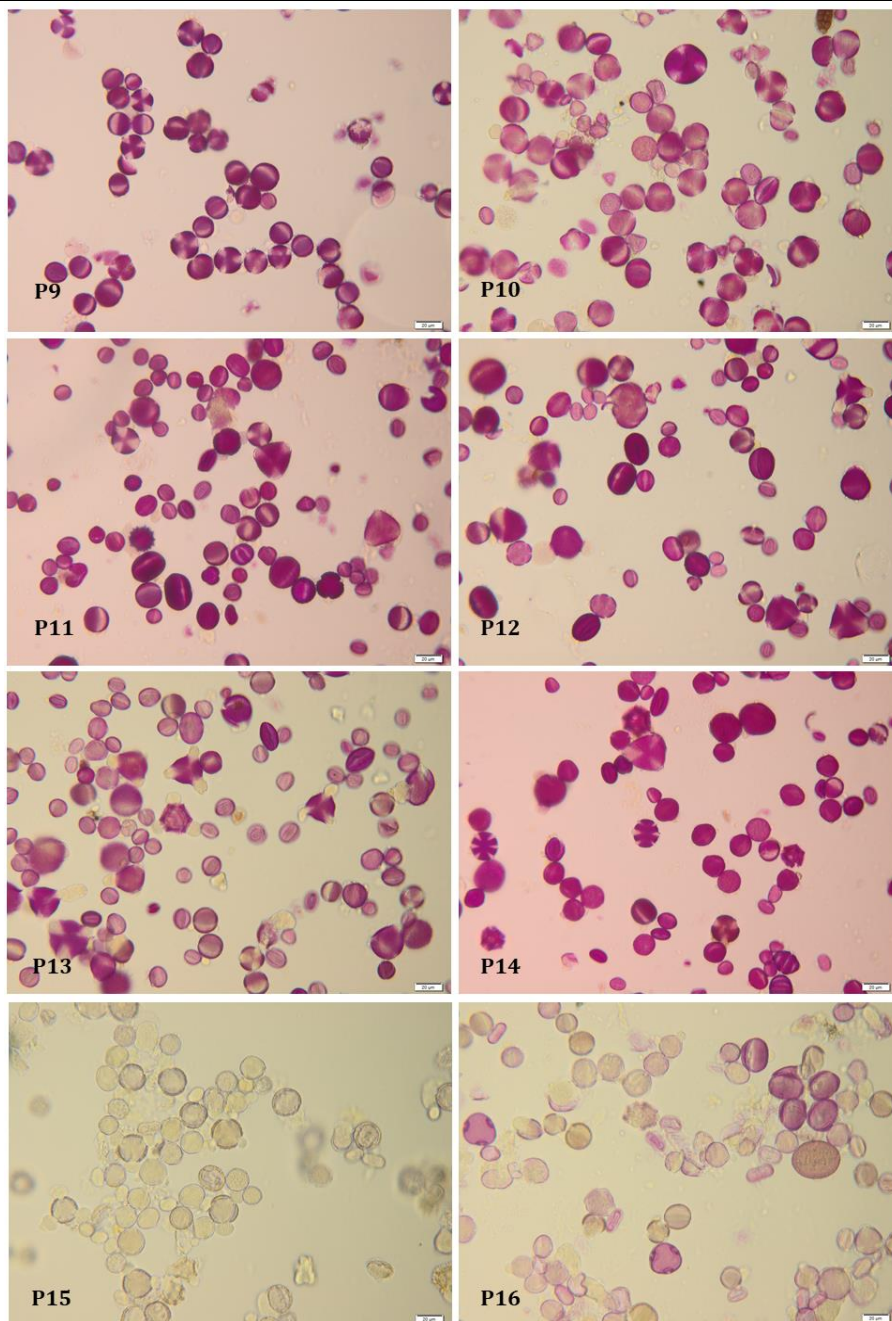


Fig. 6. Imaginea microscopică a grăunțelor de polen specifice probelor de păstură P1-P19 studiate (imagini originale)

*Fig. 6. Microscopic images of specific pollen grains of bee bread samples P1-P19 analysed (original images)*



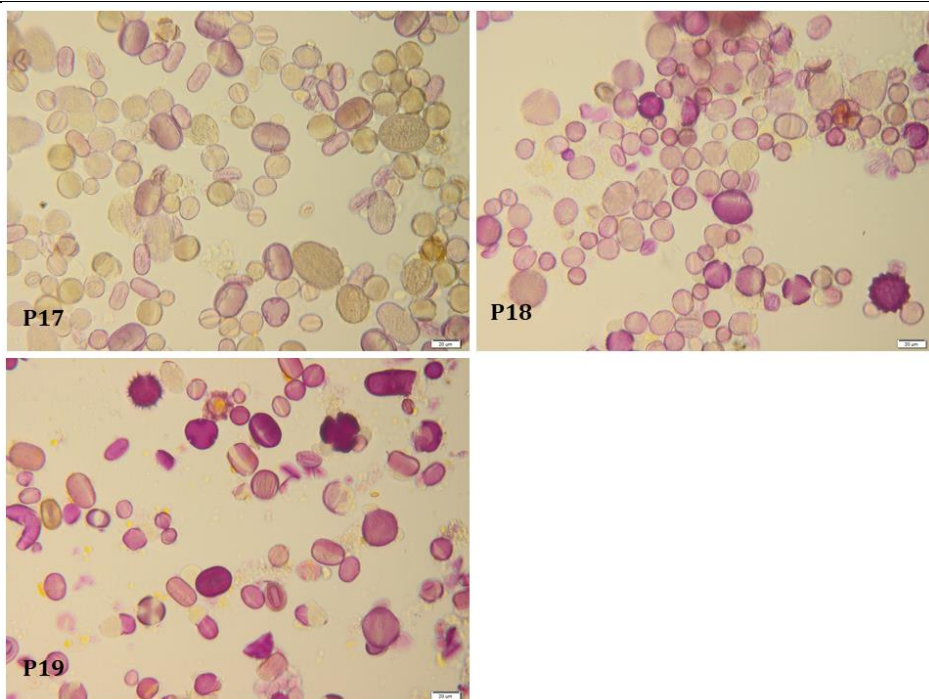


Fig. 7. Imaginea microscopică a grăunțelor de polen specifice probelor de păstură P1-P19 studiate (imagini originale)

Fig. 7. Microscopic images of specific pollen grains of bee bread samples P1-P19 analysed (original images)

Conform analizei palinologice, toate probele analizate au fost clasificate ca fiind poliflore având în compoziție tipuri și procente diferite de polen, cu excepția probelor P5 și P8 care au fost monoflore (>95% polen de *Brassica sp.*).

Din totalul de probe analizate doar în șapte a fost identificată o specie de polen predominant (>45%). Acesta a provenit de la patru familii botanice: *Rosaceae* (*Prunus sp.*), *Brassicaceae* (*Brassica sp.*), *Salicaceae* (*Salix sp.*) și *Myrtaceae* (*Eucalyptus sp.*; *Myrtus communis*). Polenul secundar a provenit de la 11 familii de plante, iar polenul minor din mai mult de 15 familii de plante (conform tabelului 5)

Familia *Salicaceae* a fost dominant (>45%) în 3 probe de păstură (P6, P11, P13) și în 5 probe a fost prezentă ca și polen secundar (P1, P3, P12, P16, P18), în timp ce familia *Brassicaceae* a fost dominantă în 2 probe de păstură (P5 și P8) cu mențiunea că în aceste probe a fost identificat aproape exclusive polen din această familie (>95% polen de *Brassica sp.*) și a fost prezentă ca și polen secundar în 4 probe (P4, P14, P16, P17). Familia *Myrtaceae* reprezentată de *Eucalyptus sp.* și *Myrtus communis* a fost identificată în păstura din India, în proba P9. Familia *Rosaceae* (*Prunus sp.*) a fost identificată în proba P1.

Tabelul 5/Table 5

**Familia și specia plantelor de la care provine polenul din probele analizate***Family and plant species of the pollen from the analyzed samples*

<b>Proba Sample</b>	<b>Polenul predominant Predominant pollen (&gt;45%)</b>	<b>Polenul secundar Secondary pollen (16- 45%)</b>	<b>Polenul important minor Important minor pollen (3-15%)</b>	<b>Polenul minor Minor pollen (&lt;3%)</b>
	<b>Familia-Specia Family-Species</b>	<b>Familia-Specia Family-Species</b>	<b>Familia-Specia Family-Species</b>	<b>Familia-Specia Family-Species</b>
<b>P1</b>	<b>Rosaceae-</b> Prunus sp.	<b>Salicaceae-</b> Salix sp.	<b>Fagaceae-</b> Quercus	
<b>P2</b>		<b>Fabaceae-</b> Lotus corniculatus <b>Fabaceae-</b> Trifolium sp.	<b>Asteraceae-</b> Centaurea sp. <b>Lamiaceae</b>	<b>Asteraceae-</b> Cirsium arvense <b>Fagaceae-</b> Quercus sp. <b>Asteraceae</b> Taraxacum sp. <b>Plantaginaceae-</b> Plantago sp. <b>Apiaceae</b>
<b>P3</b>		<b>Salicaceae-</b> Salix sp. <b>Asteraceae-</b> Bellis perennis	<b>Fabaceae-</b> Trifolium sp. <b>Rosaceae-</b> Prunus sp. <b>Boraginaceae-</b> Phacelia tanacetifolia <b>Rosaceae-</b> Rubus sp. <b>Asteraceae-</b> Centaurea sp.	<b>Asteraceae-</b> Cirsium arvense <b>Asteraceae-</b> Taraxacum <b>Apiaceae</b>
<b>P4</b>		<b>Brassicaceae-</b> Brassica sp.	<b>Asteraceae-</b> Centaurea sp. Centaurea cyanus <b>Rosaceae-</b> Rubus sp. <b>Salicaceae-</b> Salix sp. <b>Fagaceae-</b> Quercus sp. <b>Apiaceae</b> <b>Rosaceae</b>	<b>Fabaceae-</b> Vicia sp. <b>Asteraceae-</b> Matricaria sp.
<b>P5</b>	<b>Brassicaceae-</b> Brassica sp.		<b>Salicaceae-</b> Salix sp.	<b>Gramineae</b>
<b>P6</b>	<b>Salicaceae-</b> Salix sp.	<b>Rosaceae-</b> Prunus sp.	<b>Fagaceae-</b> Quercus sp.	
<b>P7</b>		<b>Fabaceae-</b> Trifolium sp. Trifolium pratense <b>Tiliaceae-</b> Tilia sp.	<b>Asteraceae-</b> Taraxacum sp. <b>Plantaginaceae-</b> Plantago sp. <b>Fabaceae-</b> Lotus corniculatus <b>Asteraceae II</b> <b>Rosaceae</b>	<b>Asteraceae-</b> Centaurea sp. <b>Lamiaceae</b>
<b>P8</b>	<b>Brassicaceae-</b> Brassica sp.			
<b>P9</b>	<b>Myrtaceae-</b> Eucalyptus sp. Myrtus communis		<b>Rutaceae-</b> Citrus	<b>Asteraceae</b>
<b>P10</b>		<b>Myrtaceae-</b> Eucalyptus sp. <b>Scrophulariaceae-</b> Capraria sp. Kerhascum sp.	<b>Asteraceae-</b> Helianthus yype <b>Chenopodiaceae-</b> Chenopodium bonus- henricus <b>Gramineae</b> <b>Neidentificat 1-</b> Polen mediu, alungit, tricolpat	<b>Asteraceae-</b> Taraxacum type <b>Juglandaceae</b>

Evaluarea potențialului bioactiv al pășturii

			<b>Neidentificat 2-</b> Polen mare, sferic, tricolpat	
<b>P11</b>	<b>Salicaceae-</b> <i>Salix sp.</i>		<b>Brassicaceae-</b> <i>Brassica sp.</i> <b>Fabaceae-</b> <i>Trifolium sp.</i> <b>Rosaceae-</b> <i>Prunus sp.</i> <b>Tiliaceae-</b> <i>Tilia sp.</i> <b>Asteraceae-</b> <i>Centaurea cyanus</i> <i>Centaurea montana</i>	<b>Boraginaceae-</b> <i>Phacelia tanacetifolia</i> <b>Asteraceae-</b> <i>Taraxacum sp.</i> <b>Asteraceae-</b> <i>Matricaria sp.</i> <b>Gramineae</b> <b>Lamiaceae</b>
<b>P12</b>		<b>Salicaceae-</b> <i>Salix sp.</i> <b>Fabaceae-</b> <i>Lotus corniculatus</i>	<b>Asteraceae-</b> <i>Centaurea sp.</i> <b>Fabaceae-</b> <i>Trifolium pratense</i> <b>Brassicaceae-</b> <i>Brassica sp.</i> <b>Lamiaceae</b>	<b>Tiliaceae-</b> <i>Tilia sp.</i> <b>Rosaceae-</b> <i>Prunus sp.</i> <b>Asteraceae-</b> <i>Centaurea sp.</i> <i>Achilea millefolium</i> <i>Bellis perennis</i> <i>Helianthus annuus</i> <i>Taraxacum sp.</i> <i>Cirsium arvense</i> <b>Gramineae-</b> <i>Zea mays</i> <b>Fabaceae-</b> <i>Onobrichys viicifolia</i> <b>Plantaginaceae-</b> <i>Plantago sp</i> <b>Rosaceae</b> <b>Apiaceae</b>
<b>P13</b>	<b>Salicaceae-</b> <i>Salix sp.</i>	<b>Rosaceae</b> <i>Prunus sp.</i>	<b>Fagaceae</b> <i>Quercus sp.</i>	<b>Asteraceae-</b> <i>Centaurea cyanus</i> <i>Matricaria sp.</i> <i>Achilea millefolium</i> <b>Brassicaceae-</b> <i>Brassica sp.</i> <b>Betulaceae-</b> <i>Carpinus betulus</i> <b>Fabaceae-</b> <i>Vicia sp.</i> <i>Lotus corniculatus</i> <i>Trifolium sp.</i> <b>Cornaceae-</b> <i>Cornus sanguinea</i> <b>Plantaginaceae-</b> <i>Plantago sp.</i> <b>Rosaceae</b> <b>Lamiaceae</b>
<b>P14</b>		<b>Boraginaceae-</b> <i>Echium vulgare</i> <b>Fabaceae-</b> <i>Trifolium sp.</i> <b>Brassicaceae-</b> <i>Brassica sp.</i>	<b>Plantaginaceae-</b> <i>Plantago sp.</i> <b>Fabaceae-</b> <i>Lotus corniculatus</i> <i>Vicia sp.</i> <b>Lamiaceae</b>	<b>Boraginaceae-</b> <i>Symphytum officinale</i> <b>Asteraceae-</b> <i>Taraxacum sp,</i> <b>Fabaceae-</b> <i>Onobrichys viicifolia</i>

<b>P15</b>		<b>Asteraceae-</b> <i>Centaurea</i> sp. <b>Fabaceae-</b> <i>Lotus corniculatus</i>	<b>Asteraceae-</b> <i>Achilea millefolium</i> <i>Helianthus annuus</i> . <b>Salicaceae-</b> <i>Salix</i> sp. <b>Plantaginaceae-</b> <i>Plantago</i> sp.	<b>Asteraceae-</b> <i>Taraxacum</i> sp. <b>Apiaceae</b> <b>Lamiaceae</b> <b>Graminae</b> <b>Rosaceae</b>
<b>P16</b>		<b>Brassicaceae-</b> <i>Brassica</i> sp. <b>Salicaceae-</b> <i>Salix</i> sp.	<b>Asteraceae-</b> <i>Centaurea cyanus</i> <b>Fabaceae-</b> <i>Trifolium</i> sp. <b>Rosaceae-</b> <i>Prunus</i> sp <b>Apiaceae</b>	<b>Polygonaceae-</b> <i>Fagopyrum esculentum</i> <b>Asteraceae-</b> <i>Centaurea</i> sp. <i>Cirsium arvense</i> <i>Taraxacum</i> sp. <b>Tiliaceae-</b> <i>Tilia</i> sp. <b>Fagaceae-</b> <i>Quercus</i> sp <b>Gramineae</b>
<b>P17</b>		<b>Brassicaceae-</b> <i>Brassica</i> sp. <b>Apiaceae</b>	<b>Asteraceae-</b> <i>Centaurea cyanus</i> <b>Fabaceae-</b> <i>Vicia</i> sp. <i>Trifolium</i> sp. <b>Salicaceae-</b> <i>Salix</i> sp.	<b>Asteraceae-</b> <i>Centaurea</i> sp. <i>Cirsium arvense</i> <b>Poygonaceae-</b> <i>Fagopyrum esculentum</i> <b>Rosaceae-</b> <i>Prunus</i> sp. <b>Fagaceae-</b> <i>Quercus</i> sp.
<b>P18</b>		<b>Fabaceae-</b> <i>Trifolium</i> sp. <b>Salicaceae-</b> <i>Salix</i> sp. <b>Asteraceae-</b> <i>Centaurea</i> sp.	<b>Brassicaceae-</b> <i>Brassica</i> sp. <b>Asteraceae-</b> <i>Matricaria</i> sp. <i>Achilea millefolium</i> <b>Graminaceae</b> <b>Lamiaceae</b> <b>Caprifoliaceae</b>	<b>Rosaceae-</b> <i>Prunus</i> sp. <b>Tiliaceae-</b> <i>Tilia</i> sp. <b>Plantaginaceae-</b> <i>Plantago</i> sp. <b>Apiaceae</b>
<b>P19</b>		<b>Boraginaceae-</b> <i>Echium vulgare</i>	<b>Fabaceae-</b> <i>Vicia</i> sp. <i>Onobrychis viicifolia</i> <i>Trifolium pratense</i> <b>Asteraceae-</b> <i>Centaurea cyanus</i> <i>Helianthus annuus</i> <i>Achilea millefolium</i> <b>Liliaceae</b> <b>Apiaceae</b> <b>Lamiaceae</b> <b>Rosaceae</b>	<b>Brassicaceae-</b> <i>Brasica</i> sp. <b>Tiliaceae-</b> <i>Tilia</i> sp. <b>Polygonaceae-</b> <i>Fagopyrum esculentum</i> <b>Asteraceae-</b> <i>Taraxacum</i> sp. <b>Plantaginaceae-</b> <i>Plantago</i> sp. <b>Caprifoliaceae</b>

Restul probelor analizate au fost extrem de poliflore (polenul identificat a provenit de la mai mult de 15 familii botanice), iar în urma analizei palinologice au fost clasificate ca fiind poliflore cu mai multe specii de polen secundar, important minor și minor.

## 4.2 Rezultate și discuții privind determinarea valorii nutritive

### 4.2 Results and discussions regarding determination of nutritive value

#### 4.2.1 Conținutul de apă lucru

##### 4.2.1 Water content

Conținutul de apă al probelor de păstură analizate a avut o medie de 11.94%. Rezultatele sunt prezentate în graficul din figura Fig. 8 și reprezintă media a trei determinări independente  $\pm$  deviația standard.

Cea mai mare valoare a conținutului de apă a fost obținută pentru proba P7 (*Fabaceae*, *Trifolium pretense*, *Tiliaceae*, *Tilia sp.*) de 17.87%, iar cea mai mica valoare pentru proba P8 (*Brassicaceae*, *Brassica sp.*), de 7.31%

Conținutul de apă al probelor crude, obținute direct de la apicultori a fost influențat într-o mai mare măsură de condițiile climatice și originea geografică cât și de modul de păstrare după recoltare.

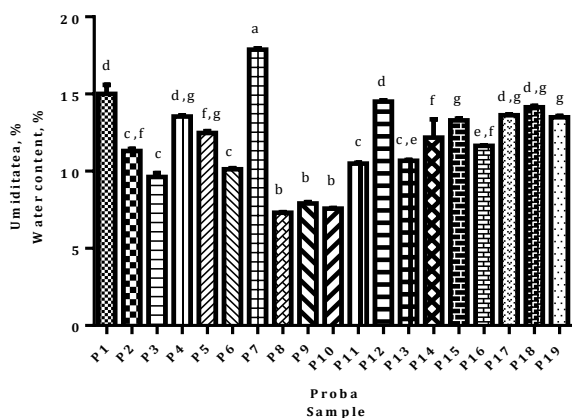


Fig 8. Conținutul de apă al probelor de păstură analizate

Fig. 8. Moisture content of analyzed bee bread samples

În cazul păsturii nu există un standard de calitate care să precizeze compoziția chimică a acesteia, drept urmare rezultatele obținute au fost comparate cu datele din literatura de specialitate.

ZULUAGA și colab., în 2015 au raportat că umiditatea în probele de păstrură columbiană a variat între 7.8 și 19.1% și a avut o medie de 15.6% , în timp ce BARENE și colab., (2014) au raportat o medie a procentului de apă mult mai ridicată, de 24%. Aceaste valori fiind mult mai scăzută comparativ cu polenul de albine proaspăt recoltat, care de obicei are umiditatea în jur de 32% (ZULUAGA și colab., 2014; BOGDANOV, 2004). Valori scăzute ale umidității au fost raportate și de CEKSTERYTE și JANSEN (2012) au obținut valori ale umidității pentru păstura poloneză cuprinse între 14.0% și

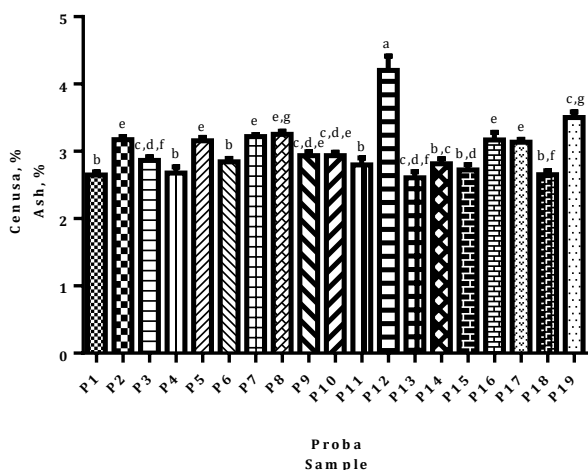
17.0%. Valorile obținute în cadrul acestui studiu sunt în conformitate cu datele din literatură.

Umiditatea ridicată din polen reprezintă un mediu ideal pentru dezvoltarea microorganismelor acesta fiind motivul pentru care polenul este mult mai perisabil decât păstura (ANDERSON și colab., 2014). Legislația națională din diferite țări a stabilit un interval cuprins între 4 și 10% pentru conținutul de apă din polen (CAMPOS și colab., 2008), dar acesta se referă la polenul uscat. Majoritatea rezultatelor obținute pentru probele de păstură sunt superioare acestui interval.

## 4.2.2 Conținutul de cenușă

### 4.2.2 Ash content

Cantitatea de cenușă reflectă conținutul total de minerale din probele de păstură și pare să fie independentă de originea botanică. Rezultatele acestei determinări sunt prezentate în graficul din figura Fig. 9 și reprezintă media a trei determinări independente  $\pm$  deviația standard.



**Fig. 9. Conținutul de cenușă al probelor de păstură**

*Fig.9. Ash content of analyzed bee bread samples*

Valorile obținute s-au situat în intervalul 2.44-3.50%, cu excepția probei P11 care au avut o valoare medie a cenușii de aproximativ 4.02%.

Valoarea superioară a cenușii, identificată în proba 11, poate fi explicată prin originea geografică diferită, dar o creștere a acestui parametru ar putea apărea și datorită contaminării cu metale grele (stupine amplasate în zone poluate).

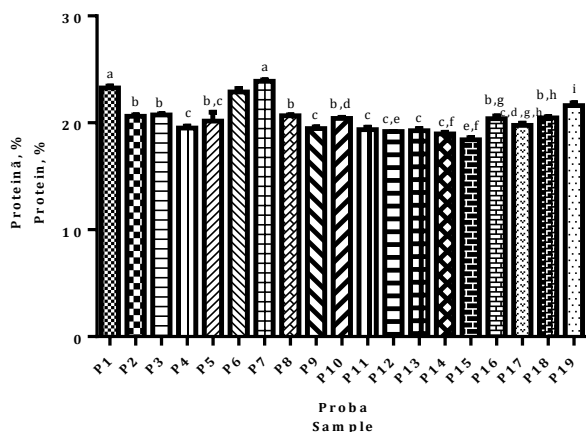
În general, valorile obținute în cadrul acestui studiu sunt în concordanță cu valorile prezentate de către TOMÁS și colab., (2017) care a raportat o medie a procentului de cenușă a probelor de păstură analizate de 3.5% și ANĐELKOVIĆ și colab., (2012) care a obținut valori de 3.05%, în timp ce media conținutului de cenușă raportat

de ZULUAGA și colab., (2015) pentru păstura columbiană a fost de 2.45 % și a variat între 2.19 și 2.60 %. Rezultatele obținute sunt susținute și de studiile anterioare, ale procentului de cenușă din polenul de albine, care recomandă pentru polenul de albine, o valoare a cenușii care să nu depășească 6% (CAMPOS și colab., 2008; NICOLSON și NICOLSON, 2011).

### 4.2.3 Conținutul total de azot

#### 4.2.3 Total nitrogen content

Cantitatea totală de proteine din probele de păstură s-a determinat prin metoda Kjeldahl descrisă în capitolul „Material și metodă”. Rezultatele sunt prezentate în grafiul din figura Fig. 10 și reprezintă media a trei determinări independente  $\pm$  deviația standard.



**Fig. 10. Conținutul de proteine al probelor de păstură analizate**

Fig. 10. Total protein content of analyzed bee bread samples

Din graficul din Fig. 10 se observă o variație a valorii proteinelor între 18.41% și 23.88%, cu o valoare medie de aproximativ 20.39%. Aceste variații între probe poate fi explicată de către originea botanică diferită a probelor.

TOMÁS și colab., (2017) au obținut pentru păstura potugheză, valori ale proteinei totale cuprinse între 14-22%, cu o medie de 18%, în timp ce SALAZAR-GONZÁLEZ și DÍAZ-MORENO, (2016) au raportat o medie a valorii proteinelor egală cu 21.1%.

Conținutul de proteine din păstură este una dintre cele mai apreciate caracteristici nutriționale. În studul realizat de ZULUAGA și colab., (2015) pe păstura columbină, aceștia au raportat valori ale proteinei care au variat între 19.1 și 27.3 % analiza a fost efectuată utilizând metoda Kjeldahl. Polenul este sursa principală de proteine utilizată de albine pentru a-și hrăni larvele, prin urmare este de așteptat să se găsească un conținut ridicat de proteine în probele de păstură. Cu toate acestea, este

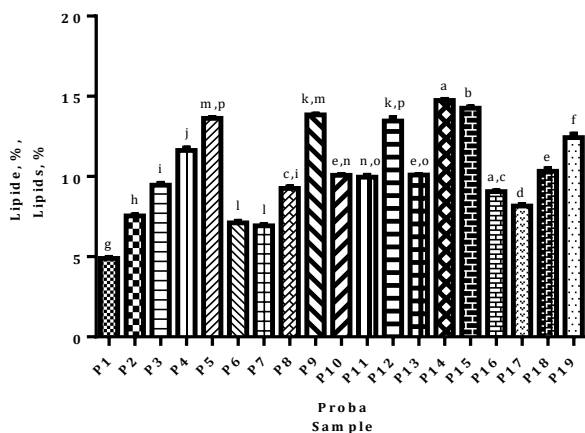
important să se sublinieze faptul că polenul colectat de către albine și polenul depozitat de către albine în stup au aproximativ aceeași cantitate de proteină, dar absorbția acestora în timpul consumului este mai eficientă în cazul păsturii datorită procesului de fermentație lactică prin care trece (NAGAI și colab., 2004) ceea ce va face ca păstura să fie un supliment alimentar mai nutritiv.

De asemenea dacă se compară aceste rezultate cu cele obținute de alți autori pentru polen (BOGDANOV, 2004), rezultatele sunt foarte asemănătoare. Pentru păstură nu există încă un standard de calitate, iar standardele propuse pentru compoziția chimică a polenului (CAMPOS și colab., 2008) au stabilit o valoare minimă de 13% (N × 5,6) pentru polenul de albine.

#### 4.2.4 Conținutul total de lipide

##### 4.2.4 Total lipid content

Conținutul în lipide a probelor de păstură a fost determinat prin metoda **Folch** descrisă în capitolul „Material și metodă”. Rezultatele sunt prezentate în graficul din figura Fig. 11 și reprezintă media a trei determinări independente ± deviația standard.



**Fig. 11. Conținutul de lipide al probelor de păstură analizate**

Fig. 11. Total lipid content of analyzed bee bread samples

Conținutul de lipide al probele analizate a variat între 4.89 (P1) și 14.74% (14). Conținutul mai mare de lipide al unor probe de păstură, de peste 14%, se poate datora prezenței altor acizi grași de exemplu din ceara de albine, asociată cu procedura de extracție a păsturii din celulele (AKHMETOVA și colab., 2012).

Conținutul de lipide din păstură este foarte variabil și este dependent de originea botanică a polenului, de cantitatea de acizi grași, carotenoide și vitamine prezente în polen. În studiul realizat de TOMÁS și colab., (2017) media conținutului de lipide din probele de păstură analizate a fost de 7.85%, cu o valoare minimă de 3.6% și



o valoare maximă de 14.9%. Aceste valori sunt comparabile cu rezultatele obținute în cadrul acestui studiu.

Conținutul total de lipide raportat de ZULUAGA și colab., (2015) a variat între 1.65 și 5.50 % cu o media 3.40 %, în timp ce SALAZAR-GONZÁLEZ și DÍAZ-MORENO (2016) au raportat o valoare medie a conținutului de lipide din păstură egală cu 6.69%.

Literatura de specialitate în ceea ce privește conținutul total de lipide este mult mai bogată în cazul polenului, iar conținutul de lipide pentru acesta este prezentat ca fiind cuprins între 1 și 13%, cu 1,3% ca limită minimă în standardele de calitate (CAMPOS și colab., 2008).

#### 4.2.5 Conținutul de glucide libere

##### 4.2.5 Free sugars content

Conținutul în glucide a celor 19 probe de păstură luate în studiu a fost determinat prin metoda HPLC-IR descrisă în capitolul „Material și metodă”.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 6 și reprezintă media a trei determinări independente  $\pm$  deviația standard.

Adăugarea, de către albine, a mierii și a nectarului la polenul pe care urmează să îl depoziteze în celulele fagurilor are impact major asupra compoziției glucidelor (SZCZESNA, 2007). Raportul fructoză/glucoză pentru probele de păstură analizate a fost cuprins între 1.28 și 2.18. Pentru probele în care *Brassica sp.* a fost predominantă, peste 97% raportul a fost similar 1.46, respectiv 1.48. Rezultatele obținute sunt comparabile cu cele existente în literatură de specialitate pentru polenul familiei *Brassicaceae*, (BONVEHI și ESCOLA, 1997; SZCZESNA, 2007), excepție făcând zaharoza care a fost absentă în toate probele analizate. Pentru proba de păstură de *Eucalyptus sp.* (India) raportul F/G a fost de 1.29. Conținutul de fructoză din toate probele de păstură analizate a fost mai mare decât cel al glucozei. În ceea ce privește zaharurile minoritare, precum turanoza și maltoza, s-au înregistrat numai cantități mai mici.

Probele P9 (cu polen predominant de *Eucalyptus sp.*) și P10 (cu polen predominant de *Salix sp.*) au fost, fără îndoială, cele mai bogate în monozaharide cu un procent mai mare de 36%.

TOMÁS și colab., (2017) au analizat glucidele din păstură prin metoda HPLC-IR, iar profilele cromatografice au arătat un conținut ridicat de fructoză și glucoză, iar arabinoza a fost de asemenea identificată în două probe. Prezența exclusivă a polenului de *Anthemis arvensis* în aceste două probe poate fi legată de prezența acestui tip de glucid. Analiza cantitativă a arătat că fructoza a fost glucidul care a avut cele mai ridicate valori, între 99 și 272 mg / g. Conținutul de glucoză a fost cuprins între 66 și 175 mg/g și a fost tot timpul mai mic decât cel de fructoză. Există puține publicații despre profilul carbohidraților din polen și chiar mai puțin despre profilul carbohidraților din păstură.

**Conținutul de glucide libere din probelor de păstură analizate\****Free sugars content of analyzed bee bread samples\**

<b>Proba Sample</b>	<b>Fructoză Fructose (%)</b>	<b>Glucoză Glucose (%)</b>	<b>Zaharoză Sucrose (%)</b>	<b>Turanoză Turanose (%)</b>	<b>Maltoză Maltose (%)</b>	<b>F/G</b>
<b>P1</b>	18.49±0.12	14.47±0.14	0.00	0.56±0.01	0.75±0.06	1.28
<b>P2</b>	17.4±0.06	8.94±0.16	0.00	0.61±0.02	1.13±0.01	1.95
<b>P3</b>	16.68±0.04	10.01±0.11	0.00	0.59±0.02	0.9±0.02	1.67
<b>P4</b>	15.76±0.03	7.26±0.12	0.00	0.49±0.06	0.94±0.02	2.17
<b>P5</b>	19.32±0.08	13.79±0.09	0.00	0.66±0.04	0.89±0.11	1.40
<b>P6</b>	19.29±0.02	10.07±0.07	0.00	0.78±0.04	0.91±0.10	1.92
<b>P7</b>	13.97±0.23	6.4±0.12	0.00	0.56±0.01	0.82±0.08	2.18
<b>P8</b>	18.29±0.04	12.46±0.16	0.00	0.65±0.03	0.82±0.06	1.47
<b>P9</b>	19.58±0.25	15.13±0.22	0.00	0.7±0.02	1.00±0.11	1.29
<b>P10</b>	21.23±0.13	14.25±0.25	0.00	0.75±0.04	1.42±0.12	1.49
<b>P11</b>	15.95±0.09	8.28±0.12	0.00	0.55±0.11	0.79±0.01	1.93
<b>P12</b>	15.46±0.09	9.15±0.14	0.00	0.57±0.08	0.87±0.04	1.69
<b>P13</b>	17.95±0.12	9.73±0.09	0.00	0.62±0.06	0.73±0.04	1.84
<b>P14</b>	20.98±0.12	12.95±0.08	0.00	0.82±0.01	1.00±0.09	1.62
<b>P15</b>	17.08±0.11	9.82±0.21	0.00	0.95±0.05	1.21±0.12	1.74
<b>P16</b>	17.19±0.14	10.61±0.24	0.00	0.77±0.10	0.14±0.02	1.62
<b>P17</b>	17.09±0.10	9.88±0.18	0.00	0.89±0.08	0.48±0.04	1.73
<b>P18</b>	17.55±0.13	10.98±0.15	0.00	0.86±0.11	0.72±0.03	1.60
<b>P19</b>	16.95±0.21	9.82±0.12	0.00	0.93±0.08	0.41±0.02	1.73
<b>Media/Mean</b>	17.70±0.10	10.74±0.14	<b>0.00</b>	0.70±0.05	0.84±0.09	<b>1.70</b>

\* rezultatele reprezintă valoarea media a trei determinări independente ± deviația standard

\*results represent the mean of three independent determination ± standard deviation

Studiul realizat de (SZCZESNA, 2007) este unul dintre puținele studii existente în literatură care a identificat și a cuantificat zaharurile individual și nu ca și diferență după determinarea proteinelor și lipidelor. SZCZESNA (2007) a studiat glucidele din polenul de albine colectat din diferite țări (Polonia, Coreea de Sud și China) folosind tehnica HPLC. Studiul a arătat că conținutul de glucide din polen este în medie de 40%. Fructoza a fost glucidul identificat în cele mai mari cantități. Aceasta a reprezentat 46% din conținutul total de zaharuri din probele examinate, urmată de glucoză cu un procent de 37%. Monozaharidele exprimate ca fructoză și glucoză au reprezentat aproximativ 83% din fracțiunea zaharurilor identificate în polen. Din dizaharidele analizate zaharoza a reprezentat 8% și maltoza 7%, iar trehaloză și turanoză aproximativ 1% fiecare.

În studiul său, SZCZESNA (2007) a clasificat probe de polen de albine din Polonia trei grupe în funcție de originea botanică. Probele aparținând grupului cu polen predominant din familia *Brassicaceae* au avut doar un raport ușor mai mic de fructoză/glucoză. Conținutul de fructoză a avut o medie de 16,96%, cel de glucoză 12,94% (raport F/G = 1,31) și un conținut de zaharoză de 2,94%. Între grupurile de probe comparate nu s-au constatat diferențe semnificative în ceea ce privește conținutul de zaharuri individuale.

QIAN și colab. 2008 au raportat o medie a conținutului de glucoză de 15.9% pentru probele din Israel, 17.5% pentru probele din China, 16% pentru probele de polen din România și 19.6% pentru probele din Spania. Conținutul de glucoză a fost mai scăzut și a avut o medie de 8.2% (Israel), 13.1% (China), 11% (România), 12.2% (Spania).

BONVEHI și ESCOLA (1997) au determinat raportul glucoză/fructoză (G/F) și au obținut valori cuprinse între 1.13 și 1.53 pentru polenul din Spania. În timp ce QIAN și colab., (2008) a obținut valori ale raportului F/G cuprinse între 1.53 și 1.66 pentru polenul din Spania, 1.94 pentru polenul din Israel, 1.33 pentru polenul din China și 1.45 pentru polenul din România.

Aceste zaharuri nu reprezintă totalul de carbohidrați din probele de păstură ci doar glucidele libere, ceea ce înseamnă că există și alte glucide, cel mai probabil legate sub formă glicozidică.

#### **4.2.6 Valoarea nutritivă**

##### **4.2.6 Nutritive value**

Carbohidrații totali au fost calculați prin diferență, după determinarea cenușii, a proteinelor și a lipidelor (MERILL și WATT, 1955).

CAMPOS și colab., (2008) a asociat prezența carbohidraților, principalii componenți ale polenului, cu polizaharide cum ar fi amidonul și materialul peretelui celular, cu valori de până la 55%. Pentru păstură datorită adăugării de miere în timpul procesului de "fabricare" de către albine, conținutul este de așteptat să fie mai ridicat. Rezultatele acestui studiu sunt confirmate de cele raportate anterior pentru păstura portugheză de către TOMÁS și colab., (2017) unde toate probele au avut un conținut de carbohidrați de peste 58%.

**Valoarea nutritive a probelor de păstură\****Nutritional value of bee bread samples\**

Proba Sample	Conținutul de apă Water content (%)	Conținutul de cenușă Ash content (%)	Conținutul de proteine Protein content (%)	Conținutul de lipide Lipid content (%)	Carbohidrați totali Total carbohydrates (%)	Valoare energetică Energy value kcal/100 g
<b>P1</b>	15.01±0.47	2.65±0.19	23.11±0.08	4.89±0.12	69.36	424.58
<b>P2</b>	11.31± 0.10	3.17±0.15	20.61±0.07	7.54±0.16	68.68	436.19
<b>P3</b>	9.62±0.21	2.86±0.11	20.74±0.08	9.46±0.22	66.94	447.43
<b>P4</b>	9.62±0.21	2.68±0.10	19.51±0.10	11.62±0.20	66.20	459.44
<b>P5</b>	13.54± 0.05	3.16±0.11	20.16±0.10	13.62±0.25	63.07	467.86
<b>P6</b>	12.47± 0.10	2.84±0.10	22.90±0.12	7.10±0.20	67.15	435.28
<b>P7</b>	10.12± 0.07	3.22±0.10	23.88±0.15	6.93±0.28	65.97	432.85
<b>P8</b>	7.31±0.03	3.25±0.18	20.65±0.08	9.19±0.18	66.90	444.49
<b>P9</b>	7.31±0.07	2.94±0.21	19.46±0.08	13.83±0.11	63.76	469.90
<b>P10</b>	7.57±0.03	2.94±0.21	20.41±0.05	10.07±0.25	66.58	450.30
<b>P11</b>	10.49±0.04	2.80±0.24	19.37±0.09	13.46±0.21	64.37	468.51
<b>P12</b>	14.51±0.07	4.02±0.10	19.18±0.10	14.74±0.20	62.06	470.19
<b>P13</b>	10.67±0.04	2.61±0.15	19.26±0.11	14.26±0.20	63.88	473.45
<b>P14</b>	12.17±0.28	2.81±0.10	18.96±0.13	9.06±0.19	69.17	445.56
<b>P15</b>	13.29±0.10	2.72±0.15	18.41±0.11	8.16±0.18	70.71	441.28
<b>P16</b>	11.64±0.03	3.17±0.16	20.39±0.08	10.33±0.11	66.11	450.73
<b>P17</b>	13.64±0.04	3.13±0.19	19.76±0.08	12.43±0.21	64.67	461.80
<b>P18</b>	14.15±0.06	2.65±0.22	20.45±0.20	9.85±0.24	67.04	450.34
<b>P19</b>	13.49±0.07	3.50±0.23	21.60±0.08	9.12±0.19	65.77	443.06
<b>Media/Mean</b>	11.94±0.14	3.01±0.18	20.46±0.10	10.30±0.18	66.23	451.22

\* rezultatele reprezintă valoarea media a trei determinări independente ± deviația standard

\*results represent the mean of three independent determination ± standard deviation

Pe baza rezultatelor obținute pentru valoarea nutritivă a păsturii, se estimează că valoarea energetică asociată cu consumul de păstură este în medie de 451.22 kcal/100 g care este chiar mai mare decât valorile observate de TOMÁS și colab., (2017) pentru păstura portugheză, de 425 kcal/100 g . Aceste rezultate confirmă faptul că păstura este o sursă bogată de nutrienți.

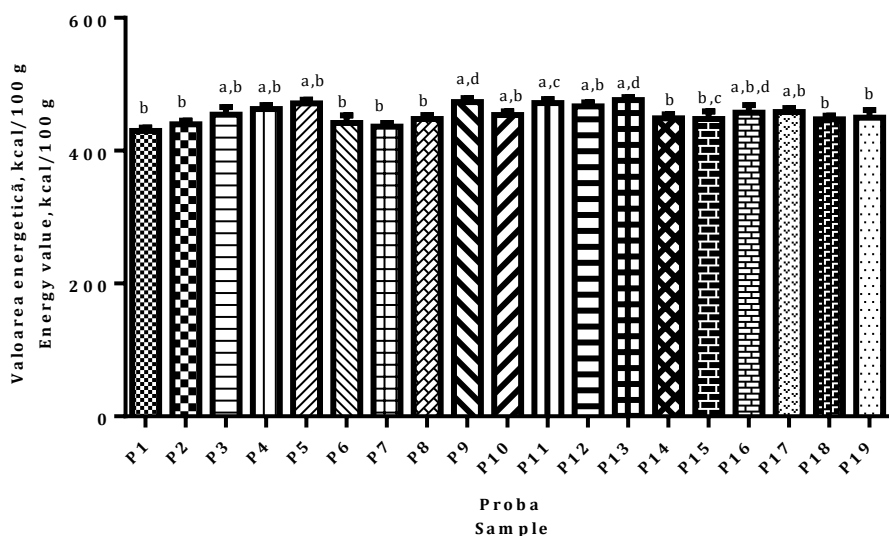


Fig. 12. Sinteza comparațiilor prin testul ANOVA a valorii nutritive a probelor de păstură analizate

Fig. 12. Summary of comparisons by ANOVA of nutritive value of bee bread analyzed samples

#### 4.2.7 pH-ului și aciditatea liberă

##### 4.2.7 pH and free acidity

În mod natural pH-ul polenului crud este mai ridicat decât cel al păsturii, iar aciditatea este mai scăzută (MĂRGHITAȘ, 2015).

Valoarea medie a pH-ului păsturii analizate a fost de 4.02, iar aciditatea a avut o medie de 4.70 meq/kg.

Atât aciditatea crescută cât și valoarea scăzută a pH-ului păsturii arată că aceasta a suferit procese fermentative care au condus la modificarea acestor parametri. Această explicație este în concordanță cu literatura de specialitate existentă pe această temă, care descrie transformarea polenului în păstură ca fiind o fermentație acidolactică în care intervin și alte microorganisme care cresc aciditatea produsului (GILLIAM, 1979; HERBERT și SHIMANUKI, 1978; FUENMAYOR și colab., 2011; DA-SILVA și colab., 2000).

Valorile pH-ului și ale acidității probelor de păstură sunt prezentate în graficul din figura 8.

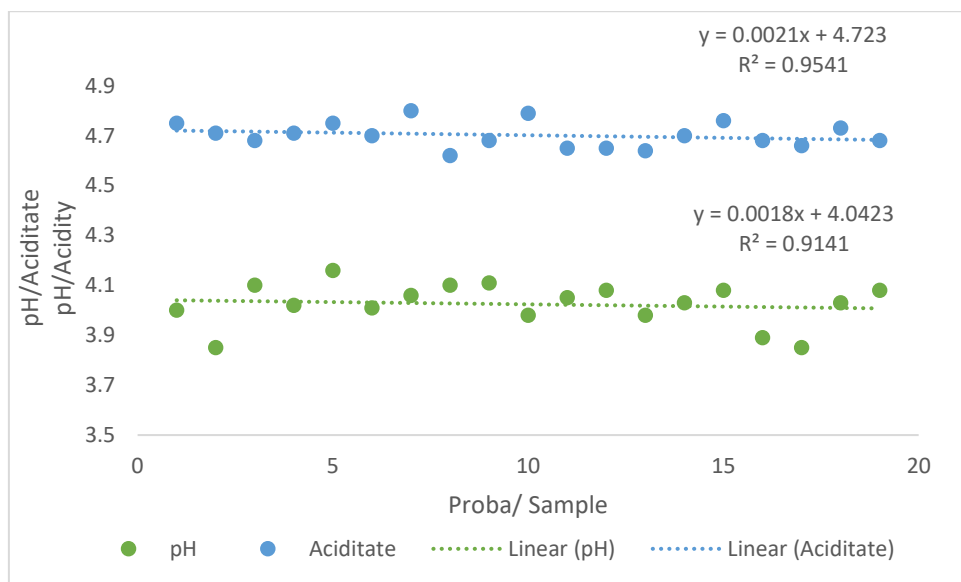


Fig. 8. Variația pH-ului și a acidității în probele de păstură

Fig. 8. Variation of pH and acidity content in analyzed bee bread sample

Valorile pH-ului măsurate în păstură sunt comparabile cu cele din literatura de specialitate FUENMAYOR și colab., (2014) și BARENE și colab., (2015) raportând valori ale pH-ului cuprinse între 3.8–4.4. Valorile obținute pt aciditate sunt în concordanță cu cele obținute de (ARANEDA și colab., 2014).

### 4.3 Rezultate și discuții privind determinare a compușilor biologic activi

#### 4.3 Results and discussions regarding biologically active compounds determination

##### 4.3.1 Conținutul de aminoacizi liberi

##### 4.3.1 Free amino acid content

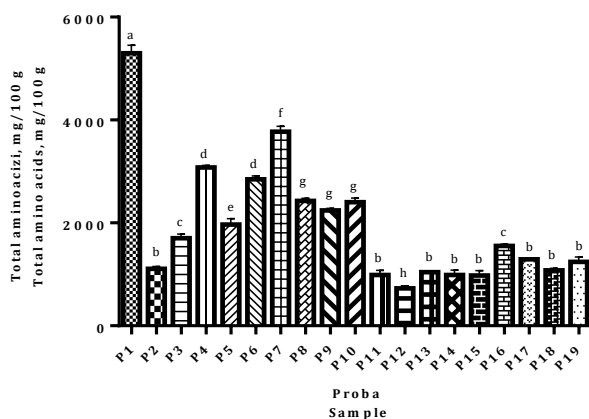
Profilului de aminoacizi liberi din probele luate în studiu a fost analizat prin metoda LC-MS descrisă în capitolul Material și metode.

Un număr de 28 de aminoacizi liberi au fost identificați și cuantificați prin metoda standardului intern, din probele de păstură. Analiza profilului aminoacizilor liberi a confirmat celelalte analize în vederea stabilirii indicilor calitativi ai probelor de păstură analizate. În probele analizate au fost identificați noua aminoacizi esențiali

(treonina, metionina, lisina, histidina, valina, triptofanul, leucina, fenilalanina și isoleucină), iar proporția în care aceștia sunt prezenți în probele de păstură este evidențiată în tabelul 8.

În studiul realizat de DEGRANDI-HOFFMAN și colab., (2015) aminoacizii au fost determinați prin metoda GS-MS. Dintre cei 10 aminoacizi esențiali, toți, cu excepția histidinei, au fost detectați în polenul studiat de (DEGRANDI-HOFFMAN și colab., 2015) și în cele mai multe cazuri, concentrațiile de aminoacizi măsurate în păstură au fost mai mari decât cele din polen. Concentrațiile de leucină și treonină au fost cu aproximativ 60% mai mari la păstură comparativ cu polenul, iar concentrația de valină a fost cu aproximativ 25% mai mare. Cantitatea de alanină, acid aspartic, glutamină și metionină a fost, de asemenea, mai mare la păstură decât la polen.

Acest studiu (DEGRANDI-HOFFMAN și colab., 2015) este singurul care prezintă comparativ cantitățile de aminoacizi ale păsturii produse de *Apis mellifera* și *Apis Dorsata*. Concentrațiile de aminoacizi nu diferă foarte mult între păstura produsă de albinele africane și albinele europene, cu excepția fenilalaninei și cisteinei. Cantitatea de fenilalanină a fost de aproximativ două ori mai ridicată la probele provenite de la albinele africane (*Apis Dorsata*) comparativ cu albinele europene (*Apis mellifera*) sau polen. Valoarea cisteinei a fost mai scăzută la probele provenite de la albinele europene comparativ cu cele provenite de la albinele africane sau polen. Triptofanul a fost singurul aminoacid prezent în concentrații mai mari în polen decât păstura provenită de la ambele specii de albine. Concentrația de prolină în polen și în păstura europeană a fost mai mare decât în păstura africană. Aceste diferențe ar putea fi datorită metodei analitice diferite de determinare, dar și a originii botanice a polenului.



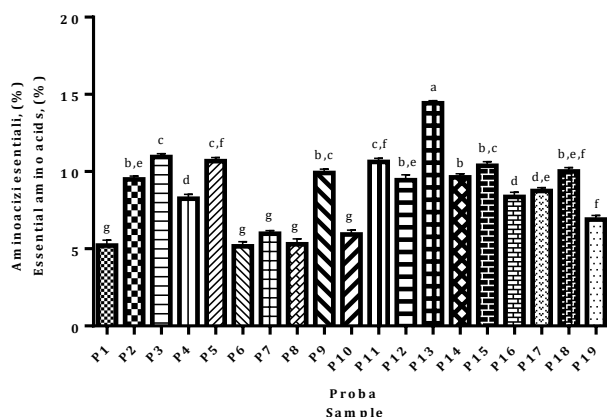
**Fig. 12. Analiza varianței conținutul total de aminoacizi din probele analizate**

Fig. 12. Analysis of variance of total amino acids content form analyzed samples

Proba P1 (*Rosaceae*, *Salicaceae*, *Fagaceae*) a fost caracterizată prin cantitatea cea mai mare de aminoacizi și anume, 5385.97 mg/100g, în timp ce pentru proba P12

(*Salicaceae, Fabaceae, Asteraceae, Fabaceae, Brassicaceae, Lamiaceae*) s-a înregistrat cea mai mică valoare a aminoacizilor totali, 697.87 mg/100g.

Între probele de păstură îndină au existat diferențe semnificative valorile obținute fiind 2403.18 mg/100g pentru P8 (*Brassicaceae*), 2220.99 mg/100g P9 (*Myrtaceae*) și 2356.75 mg/100g (*Myrtaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae*).



**Fig. 13. Analiza varianței conținutul de aminoacizi esențiali din probele analizate**

Fig. 13. Analysis of variance of essential amino acids content form analyzed samples

Cantitatea de aminoacizii esențiali din componența probele analizate a variat între 336,54 g/100 g probă (P7 - *Fabaceae, Tiliaceae, Asteraceae, Plantaginaceae, Rosaceae*) și 64.45 g/100 g probă (P12 – *Salicaceae, Fabaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Lamiaceae*).

O astfel de variație a conținutului în aminoacizi este influențată de originea florală, factorii biologici, ecologici și geografici din timpul producției, precum și de manipularea și condițiile de depozitare a păsturii.

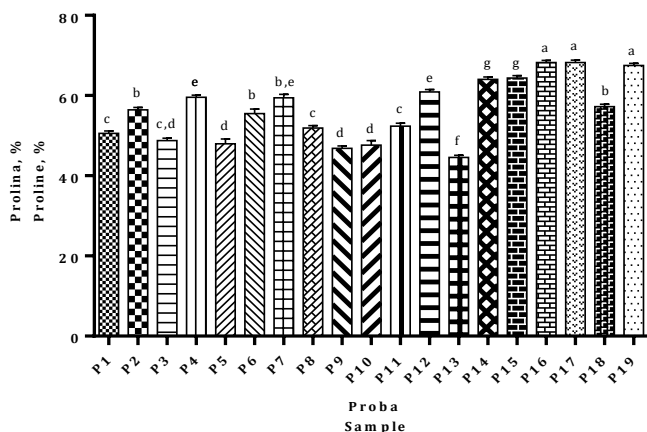
Prezența tuturor aminoacizilor esențiali este asociată cu calitatea produsului și fac din păstură un excelent supliment alimentar, iar echilibrul optim între aminoacizi în dietă este esențial pentru homeostazia întregului corp (WU, 2009).

Prezența lizinei în cantitățile cele mai ridicate (118,82 g/100 g păstură în proba P7, cu o medie de 35.51 g/100 g păstură), urmată îndeaproape de hisitidină (65.67 g/100 g păstură tot în proba P7, cu o medie de 31.10 g/100 g păstură), arată că acest produs al stupului poate fi utilizat ca și supliment alimentar aducând un aport de substanțe biologice importante pentru organismul uman.

Lizina este direct implicată în metilarea proteinelor, activitatea antivirală, în absorbția calciului și sinteza și funcția collagenului, iar histidina este un aminoacid esențial pentru toate mamiferele este direct implicată în metilarea proteinelor; structura și funcția hemoglobinei; ajută la producerea unor dipeptide antioxidante și indirect prin histamine (este un precursor al histaminei - această este eliberată de



celulele din sistemul imunitar în timpul reacțiilor alergice) în reacția alergică; are efect vasodilatator și în modularea răspunsului imun din piele (ELANGO și PENCHARZ, 2009; WU, 2009).



**Fig. 14. Analiza varianței conținutul de prolină din probele analizate**

Fig. 14. Analysis of variance of proline content from analyzes samples

Prolina este aminoacidul care a fost identificat în cele mai mari cantități în toate probele studiate, a avut o medie de 993.45 g/100 g probă. Valoarea cea mai ridicată a fost identificată în proba P1 (*Rosaceae*, *Salicaceae*, *Fagaceae*) și a fost 2706.14 g/100 g probă.

Prolina este direct implicată în structura și funcția collagenului, ajută funcția neurologică și este indirect implicată în sinteza AND-ului, proliferarea limfocitelor, în sinteza ornitinei, citrulinei, arginină și poliaminei; Deși este sintetizată de către organismul uman, au fost observate scăderi ale nivelului de prolină din organism în cazul efortului prelungit și astfel este posibil ca persoanele ce sunt expuse efortului prelungit (ex. sportivi) să fie nevoite să consume suplimente alimentare pe bază de prolină (WU, 2009).

În studiul realizat de SZCZÊSNA (2006) polenul aparținând familiei *Brassicaceae* a prezentat cele mai ridicate valori și anume 228.97 mg/g. În acest studiu au fost identificați un total de 17 aminoacizi și totuși aminoacizii cu excepția triptofanului. Valorile obținute în acest studiu pentru probele cu polen predominant din familia *Brassicaceae* au avut valori mult mai mici 1904.51 mg/100g, respective 2403.18 mg/100g.

Valorile obținute pentru aminoacizii totali sunt în conformitate cu cele obținute de GONZALEZ-PARAMAS și colab., (2006) care a identificat 32 în polenul spaniol de *Cistus* și *Echium* și a raportat valori cuprinse între 30.90 și 22.20 mg/g.

Tabalul 8 (Table 8) *Conținutul de aminoacizi liberi din probele de păstură analizate\***Free amino acids content of analyzed bee bread samples\**

Aminoacid Amino acid Mg/100g	Proba/Sample																		
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
(ARG)	200.01	10.50	91.73	22.76	26.30	110.06	23.04	107.42	26.71	25.7 4	33.6 8	14.0 1	59.48	8.80	7.61	18.15	11.02	10.02	10.02
(GLN)	115.93	60.11	92.36	123.41	102.56	82.89	103.6 7	63.79	107.9 4	103. 63	60.4 7	25.8 6	23.11	32.2 9	39.8 2	55.46	44.81	41.33	25.04
(SER)	143.70	18.99	45.49	62.59	77.05	71.44	101.3 0	72.41	104.3 3	71.9 3	26.0 9	18.0 9	33.80	20.9 0	15.0 9	28.71	25.77	28.99	18.25
(ASN)	969.26	47.78	163.1 5	112.93	117.60	338.18	201.5 9	330.49	133.2 3	196. 39	57.8 0	35.1 5	107.8 3	38.1 9	26.5 2	42.54	20.77	76.13	52.42
(1-MHIS)	14.9	0.13	15.44	6.10	0.68	10.24	8.40	9.97	0.51	6.95	3.62	2.47	4.30	1.89	5.52	3.77	3.75	6.09	2.66
(HYP)	98.38	19.82	30.99	30.68	8.48	52.96	49.26	55.25	11.15	49.8 6	15.4 6	7.62	21.68	8.60	17.0 5	12.68	12.24	25.14	11.15
(GLY)	25.94	18.25	8.68	39.02	45.86	21.20	33.25	17.42	30.48	25.1 8	7.53	5.36	6.34	8.83	4.21	13.30	6.42	4.39	9.00
(GPR)	0.68	19.03	0.08	0.82	0.69	0.26	0.72	0.21	0.38	0.18	0.08	0.04	0.10	0.14	0.04	0.11	0.13	0.10	0.09
(THR)	51.25	0.13	15.44	33.48	43.86	20.92	40.50	21.10	36.07	21.6 4	11.4 9	5.69	9.44	8.35	5.16	13.14	7.00	5.72	7.81
(ALA)	178.36	5.77	55.9	166.77	130.16	106.19	164.8 5	71.25	164.0 8	131. 82	27.1 8	23.1 3	35.54	42.8 5	27.0 3	73.02	48.06	28.78	49.56
(HLY)	0.00	74.68	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
(GABA)	284.93	39.02	52.79	205.91	201.84	73.3	232.4 7	81.86	259.0 8	167. 17	43.1 1	36.8 2	61.71	38.2 4	43.0 4	53.60	65.17	59.13	57.35
(SAR)	3.36	1.25	1.40	9.47	5.25	4.85	5.41	2.78	0.68	2.07	0.48	0.53	0.62	0.75	0.22	1.12	0.97	0.14	0.97
(BAIBA)	0.00	0.00	1.12	0.50	0.00	1.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.92	0.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.32	0.00
(ABA)	2.98	1.85	0.66	1.85	1.45	2.62	1.44	1.59	0.75	3.18	1.22	0.57	0.00	1.29	0.00	0.00	5.43	1.38	2.99
(ORN)	4.84	0.76	1.76	3.62	2.49	4.88	5.79	2.94	3.02	3.61	0.91	1.03	1.37	0.85	1.14	1.02	0.96	1.37	0.87
(MET)	5.59	2.75	3.30	3.58	2.52	1.53	6.02	1.33	5.91	4.91	3.13	1.58	49.67	2.64	2.15	3.58	3.13	2.72	2.22
(PRO)	2706.1 4	607.5 3	813.1 3	1828.8 2	901.39	1542.4 1	2225. 12	1239.7 8	1033. 36	1106. 55	484. 84	422. 70	465.6 9	593. 65	589. 99	1039. 62	869.9 5	605.7 5	807.9 6

# Evaluarea potențialului bioactiv al păsturii

<b>(LYS)</b>	44.52	16.43	40.72	77.68	65.65	35.59	118.8 2	36.57	66.89	26.1 2	16.5 1	16.2 3	31.35	17.1 1	25.3 1	29.86	27.95	19.98	20.52
<b>(ASP)</b>	267.85	44.56	75.32	153.91	57.58	173.74	175.7 0	153.62	75.25	275. 80	49.0 1	29.4 8	48.77	34.9 2	39.7 3	44.25	42.09	44.96	43.95
<b>(HIS)</b>	86.93	43.22	64.72	48.77	6.63	27.00	65.67	24.62	9.55	48.3 1	28.6 6	16.9 6	18.70	15.3 0	35.8 4	19.86	23.67	40.37	12.38
<b>(TPR)</b>	0.41	0.10	0.09	0.14	0.18	0.23	0.19	0.19	0.22	0.32	0.05	0.00	0.03	0.04	0.02	0.04	0.05	0.02	0.02
<b>(VAL)</b>	40.48	8.14	13.04	32.83	29.33	24.39	35.98	17.20	38.22	29.1 2	8.63	5.06	9.61	9.28	4.53	14.07	9.27	6.23	8.87
<b>(GLU)</b>	90.25	3.42	26.3	27.32	15.58	70.28	28.34	63.88	40.26	12.4 7	11.1 0	4.90	21.58	3.55	3.85	9.30	5.85	5.23	12.37
<b>(TRP)</b>	9.82	1.20	3.66	2.69	4.79	7.54	5.90	6.56	7.82	4.34	1.86	0.71	1.49	0.74	1.18	2.03	1.38	1.60	1.05
<b>(LEU)</b>	12.61	12.72	15.36	21.96	22.84	9.01	28.38	7.79	35.30	14.6 1	16.7 2	8.27	15.85	14.9 4	8.85	21.92	18.58	11.97	12.48
<b>(PHE)</b>	11.24	12.27	14.75	14.98	14.66	7.78	22.18	7.39	17.05	13.1 5	13.2 2	6.57	10.57	12.2 5	8.21	13.04	11.02	11.32	10.33
<b>(ILE)</b>	7.28	4.40	8.05	10.60	10.51	5.24	13.08	0.00	0.31	0.00	0.19	3.38	6.22	7.91	2.83	7.68	8.20	3.91	4.62
<b>(TYR)</b>	8.27	6.88	9.64	11.23	8.59	6.45	14.79	5.74	12.44	11.7 2	9.65	5.33	8.38	7.57	5.99	9.97	6.59	7.92	6.55
<b>Total aminoacizi liberi</b>	5385.9 7	1083. 01	1655. 27	3054.4 2	1904.5 1	2812.4 1	3711. 90	2403.1 8	2220. 99	2356 .75	933. 62	697. 87	1053. 24	931. 87	920. 93	1531. 83	1280. 89	1052. 00	1191. 48

\*Rezultatele reprezintă media a trei determinări independente.

\*Results represent the mean of three independent determination

ARG=Arginina, GLN=Glutamina, SER=Serina, ASN=Aspargina, 1MHIS=1-metil-histidina, HYP=4-hidroxiprolina, GLY=Glicina, GPR=Glicina-prolina (dipeptida), THR=Treonina, ALA=Alanina, HLY=Hidroxilisina, GABA=Acid gama-aminobutiric, SAR=Sarcosina,  $\beta$ AIBA=Acid beta-aminoisobutiric, ABA=Acid alfa-aminobutiric, ORN=Ornitina, MET=Metionina, PRO=Prolina, LYS=Lizina, ASP=Acid aspartic, HIS=Histidina, TPR=Thiaproline, VAL=Valina, GLU=Acid glutamic, TRP=Triptofan, LEU=Leucina, PHE=Fenilalanina, ILE=Izoleucina, TYR=Tirozina.

### 4.3.2 Conținutul de acizi grași

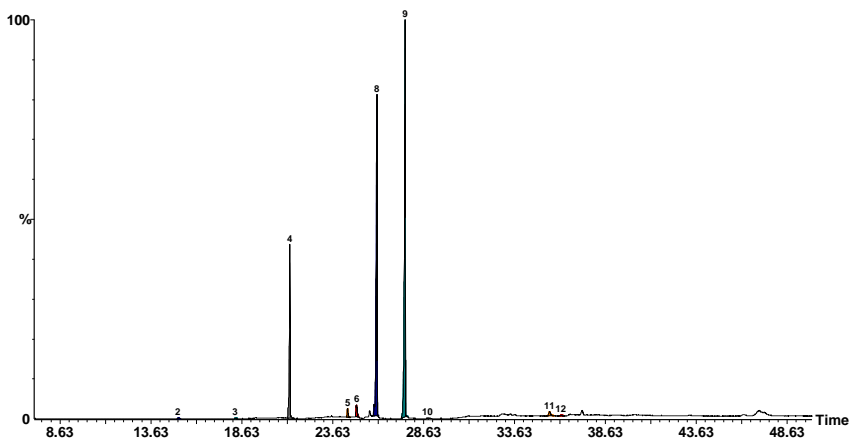
#### 4.3.2 Fatty acids content

Esterii metilici ai acizilor grași (EMAG/*FAME*) au fost determinați prin metoda GS-MS descrisă în capitolul Material și Metode, din lipidele totale.

Acizii grași polinesaturați (PUFA), cum ar fi  $\omega$ -3 și  $\omega$ -6 sunt esențiali pentru organismul uman și trebuie consumați deoarece organismul uman nu are capacitatea de a-i sintetiza. De asemenea se cunoaște faptul că acizii grași predominanți prezenți în polen sunt: acidul palmitic, acidul oleic, acidul linoleic și acidul  $\alpha$  – linolenic (NICOLSON, 2011).

În tabelul 9 este sintetizată compoziția în acizi grași a probelor de păstură studiate. Valorile prezentate reprezintă media a trei determinări independente.

În general, nu au existat mari diferențe calitative ale profilului de acizi grași al probelor analizate, excepție făcând acidul elaidic [18:1 (9 t) (n-9)] prezent doar în probele P2 (*Fabaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*) și P3 (*Salicaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Boraginaceae*) și acidul capric care a fost prezent în cantități mici doar în cinci probe P1(*Rosaceae*, *Salicaceae*, *Fagaceae*), P2 (*Fabaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*), P3 (*Salicaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Boraginaceae*) P4 (*Brassicaceae*, *Asteraceae*, *Rosaceae*, *Salicaceae*, *Fagaceae*, *Apiaceae*) și P8 (*Brassicaceae*).



**Fig. 15. Cromatogramă GS-MS a esterilor metilici ai acizilor grași (FAMES) din lipidele totale (TL) a probei P6 de păstură. Identificarea semnalelor cromatografice: (1) Ac. capric (10:0); (2) Ac. lauric (12:0); (3) Ac. miristic (14:0); (4) Ac. palmitic (16:0); (5) Ac. stearic (18:0); (6) Ac. oleic [18:1 (n-9)]; (7) Ac. elaidic [18:1 (9 t) (n-9)]; (8) Ac. linoleic [18:2 (n-6)]; (9) Ac.  $\alpha$ -linolenic[18:3 (n-3)]; (10) Ac. arahidic (20:0); (11) Ac.behenic (22:0); (12) Ac. Erucic [22:1 (n-9)].**

*Fig. 15. GC-MS chromatogram of FAMES in the TL of bee bread (P6). Peak identification: (1) Capric (10:0); (2) Lauric (12:0); (3) Myristic (14:0); (4) Palmitic (16:0); (5) Stearic (18:0); (6) Oleic [18:1 (n-9)]; (7)Elaidic [18:1 (9 t) (n-9)]; (8) Linoleic [18:2 (n-6)]; (9)  $\alpha$ - Linolenic[18:3 (n-3)]; (10) Arachidic (20:0); (11)Behenic (22:0);(14) Erucic [22:1 (n-9)]acids.*

Tabelul 9 (Table 9)

**Compoziția acizilor grași (% din lipidele totale) din probele de păstură\****Fatty acid composition (% of total fatty acids) of bee bread\**

<b>Proba/Sample</b>																			
<b>Acid gras/ Fatty acid</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>	<b>P7</b>	<b>P8</b>	<b>P9</b>	<b>P10</b>	<b>P11</b>	<b>P12</b>	<b>P13</b>	<b>P14</b>	<b>P15</b>	<b>P16</b>	<b>P17</b>	<b>P18</b>	<b>P19</b>
<b>(10:0)</b>	0.14	0.14	0.05	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00
<b>(12:0)</b>	0.14	0.35	0.32	0.11	0.01	0.07	0.02	0.03	0.01	0.03	0.03	0.04	0.03	0.04	0.04	0.31	0.04	0.05	0.02
<b>(14:0)</b>	0.25	0.19	0.22	0.21	0.25	0.06	0.06	0.16	0.15	0.03	0.08	0.05	0.26	0.23	0.18	0.22	0.06	0.71	0.27
<b>(16:0)</b>	16.67	24.83	17.94	10.48	20.04	13.66	46.66	21.25	19.82	39.99	19.64	25.05	23.51	27.63	22.51	27.89	20.32	33.34	23.19
<b>(18:0)</b>	2.43	2.04	1.13	0.87	0.45	1.03	0.14	1.80	0.28	0.18	0.28	0.04	0.77	0.70	0.56	1.92	0.10	0.06	0.44
<b>18:1 (n-9)</b>	14.95	6.17	2.63	1.48	0.39	1.84	0.30	1.87	0.31	0.38	0.63	0.37	1.54	1.40	1.36	7.97	1.83	0.55	0.44
<b>18:1(9t) (n-9)</b>	0.00	0.54	0.07	0.02	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.00	0.00	0.00
<b>18:2 (n-6)</b>	32.36	14.34	11.74	3.09	1.29	36.99	34.48	54.09	1.44	39.46	20.08	10.20	24.02	23.55	34.15	16.10	30.89	11.70	17.07
<b>18:3 (n-3)</b>	30.23	48.18	65.04	82.77	77.16	45.22	18.11	18.78	77.63	19.01	58.87	63.61	48.96	45.28	40.14	40.44	45.68	53.02	58.05
<b>(20:0)</b>	1.25	1.93	0.11	0.16	0.05	0.09	0.08	0.88	0.05	0.11	0.34	0.62	0.04	0.04	0.04	2.28	0.08	0.56	0.06
<b>(22:0)</b>	1.16	1.16	0.74	0.63	0.26	0.92	0.07	0.93	0.22	0.71	0.05	0.01	0.86	1.12	1.02	1.14	0.92	0.01	0.31
<b>22:1 (n-9)</b>	0.43	0.14	0.00	0.17	0.09	0.13	0.00	0.19	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.23	0.08	0.00	0.15
<b>Σn-3 PUFAs</b>	30.23	48.18	65.04	82.77	77.16	45.22	4.16	18.78	19.01	18.11	58.87	63.61	48.96	45.28	40.14	40.44	45.68	53.02	58.05
<b>Σn-6 PUFAs</b>	32.36	14.34	11.74	3.09	1.29	36.99	63.82	54.09	39.46	34.48	20.08	10.20	24.02	23.55	34.15	16.10	30.89	11.70	17.07
<b>Σn-9 PUFAs</b>	15.38	6.31	2.63	1.64	0.48	1.97	2.44	2.06	0.38	0.30	0.63	0.37	1.54	1.40	1.36	9.20	1.91	0.55	0.59
<b>n-6/n-3</b>	1.07	0.30	0.18	0.04	0.02	0.8	1.9	2.8	0.02	1.90	0.34	0.16	0.49	0.52	0.85	0.40	0.68	0.22	0.29

\*Rezultatele reprezintă media a trei determinări independente.

\*Results represent the mean of three independent determinations.

PUFAs = acizi grași polinesaturați (PUFAs-*polyunsaturated fatty acids*)

(10:0) – Acid capric; (12:0)- Acid lauric; (14:0) - Acid miristic; (16:0) - Acid palmitic; (18:0) - Acid stearic; [18:1 (n-9)] - Acid oleic; [18:1 (9 t) (n-9)] - Acid elaidic; [18:2 (n-6)] - Acid linoleic; [18:3 (n-3)] - Acid  $\alpha$ -linolenic; (20:0) - Acid arahidic; (22:0) - Acid behenic; [22:1 (n-9)] Acid erucic.

În extractele lipidice analizate au fost identificați 12 acizi grași (Tabelul 9). Acidul  $\alpha$ -linolenic [18:3 (n-3)], a fost identificat în cea mai mare cantitate și a avut valori cuprinse între 18.11% (P7) și 82.77% (P4), urmat de acidul palmitic (16:0) cu valori care au variat între 10.48 (P1) și 46.66 (P7) și de acidul linoleic [18:2 (n-6)] cu valori cuprinse între 1.29 (P5) și 32.46 (P10).

Acidul capric (10:0), acidul lauric (12:0), acidul miristic (14:0), acidul stearic (18:0), acidul oleic [18:1 (n-9)], acidul elaidic [18:1(9t)(n-9)], acidul arahidic (20:0), acidul behenic(22:0) și acidul erucic [22:1 (n-9)] au fost în cantități mai mici (<3%), lucru confirmat și de către (SZCZESNA, 2006).

În ceea ce privește rapoartele n-6/n-3 (PUFAs) valorile au variat între 0.02 (P5) și 2.88 (P8). Valoarea medie a raportului n-6/n-3 a fost de 0.69, valoare care este apropiată de valorile identificate de (CEKSTERYTE și JANSEN 2012; KAPLAN și colab., 2016) (n-6/n-3 = 1-5/1).

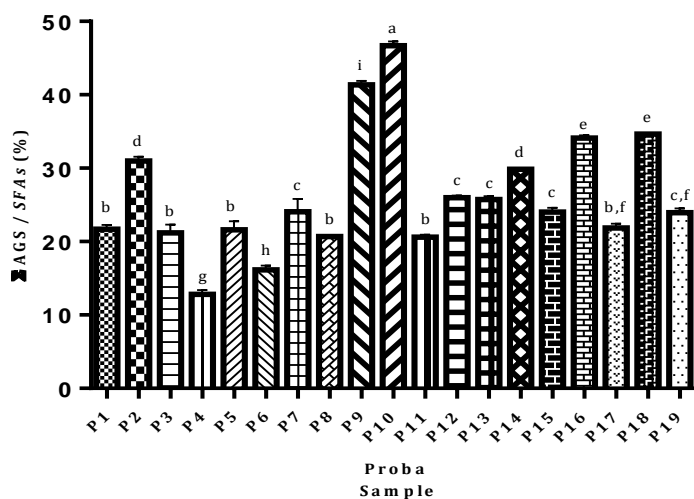
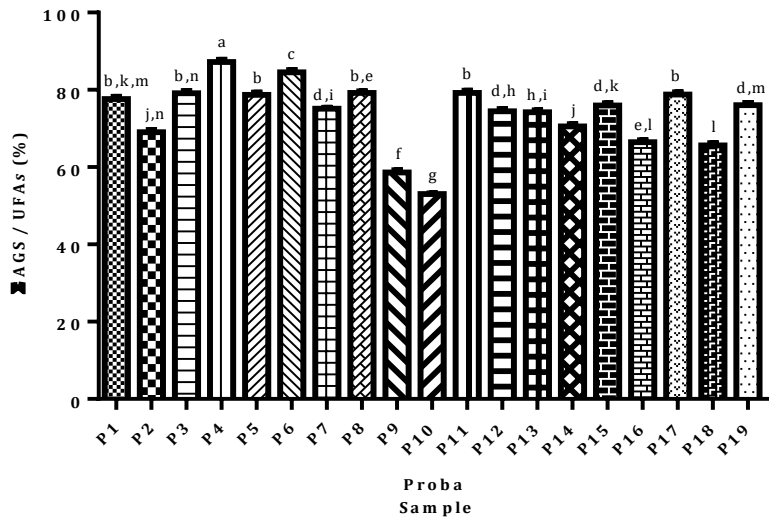
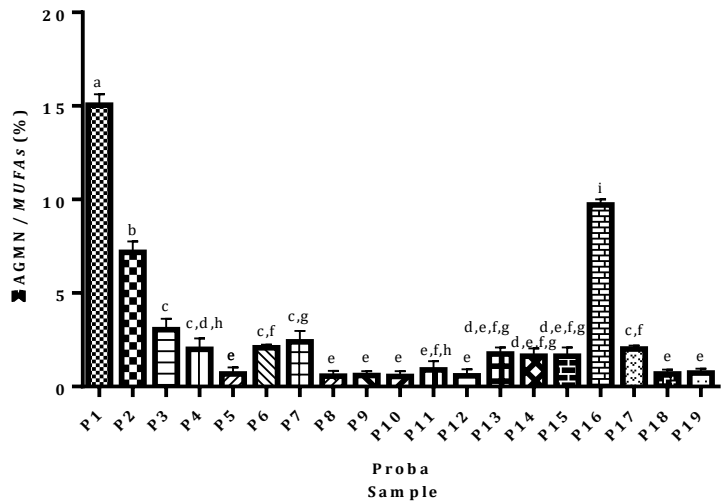


Fig. 16. Variația acizilor grași saturați în probele de păstură

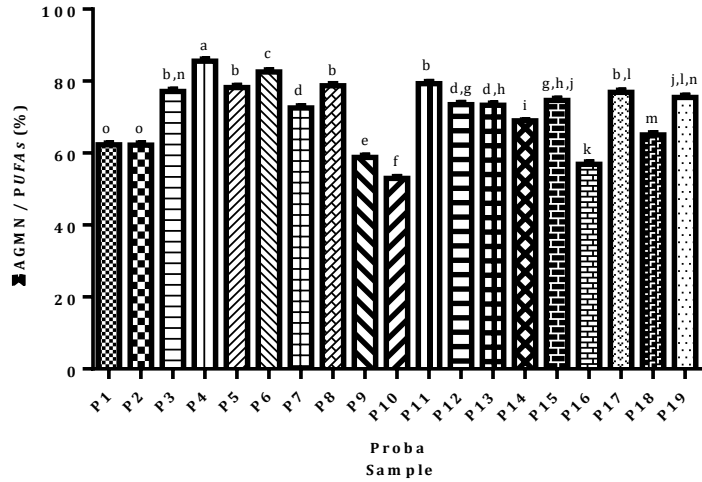
Fig. 16. Variation of saturated fatty acids in bee bread samples



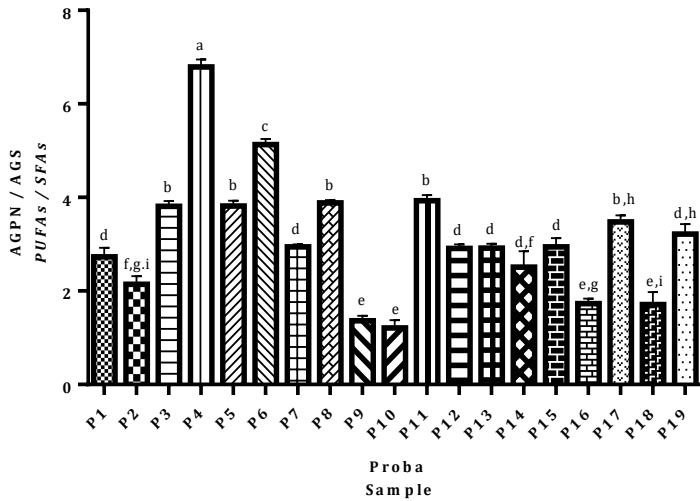
**Fig. 17. Variația acizilor grași nesaturați în probele de păstură**  
Fig. 17. Variation of unsaturated fatty acids in bee bread samples



**Fig. 18. Variația acizilor grași mononesaturați în probele de păstură**  
Fig. 18. Variation of MUFAs - monounsaturated fatty acids in bee bread samples

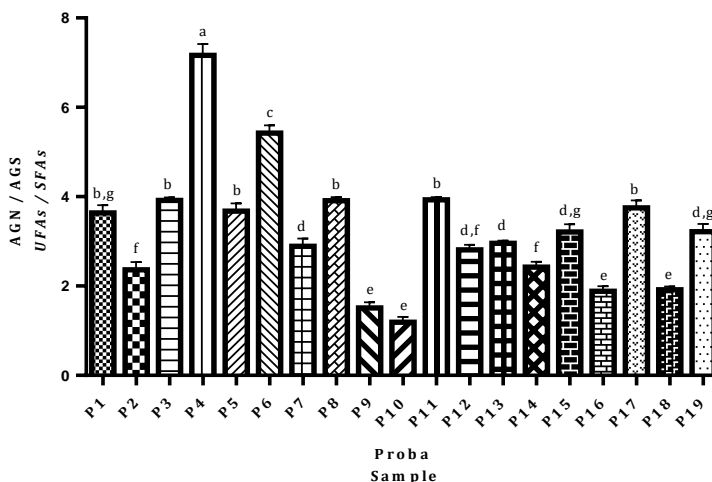


**Fig. 19. Variația acizilor grași polinesaturați în probele de păstură**  
 Fig. 19. Variation of PUFAs - polyunsaturated fatty acids in bee bread samples



**Fig. 20. Raportul dintre acizii grași polinesaturați și saturați în probele de păstură**  
 Fig. 20. Ratio of polyunsaturated fatty acids to saturated fatty acids in bee bread samples





**Fig. 21. Raportul dintre acizii grași nesaturați și saturați în probele de păstură**  
 Fig. 21. Ratio of unsaturated fatty acids to saturated fatty acids in bee bread samples

Analiza statistică a claselor de acizi grași au arătat diferențe semnificative ( $p < 0.05$ ) între probe de păstură analizate. Cele mai mari valori pentru acizii grași saturați (SFAs) ( $p < 0.05$ ) au fost înregistrat în lipidele totale ale probelor P10 (*Myrtaceae*, *Scrophulariaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*) și P9 (*Myrtaceae*) (~46%). Probele P4 (*Brassicaceae*, *Asteraceae*, *Rosaceae*, *Salicaceae*, *Fagaceae*, *Apiaceae*) și P6 (*Salicaceae*, *Rosaceae*, *Fagaceae*) au avut cel mai ridicat ( $p < 0.05$ ) conținut de acizi grași nesaturați (~87%). Probele P1 (*Rosaceae*, *Salicaceae*, *Fagaceae*), P2 (*Fabaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*) și P16 au fost cele mai bogate în acizi grași mononesaturați, iar probele P4 (*Brassicaceae*, *Asteraceae*, *Rosaceae*, *Salicaceae*, *Fagaceae*, *Apiaceae*), P6 (*Salicaceae*, *Rosaceae*, *Fagaceae*), P8 (*Brassicaceae*), P11 (*Salicaceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Tiliaceae*, *Asteraceae*) în acizi grași polinesaturați ( $p < 0.05$ ).

Media acizilor grași nesaturați (73.78%) a fost mai mare comparativ cu cea a acizilor grași saturați (23.13%). De asemenea media acizilor grași polinesaturați a fost mult mai ridicată (71.23%) comparativ cu cei mononesaturați (2.64%) rezultatele obținute coincid si cu cele raportat de către KAPLAN și colab., (2016).

Acizii grași nesaturați au efecte benefice asupra sănătății umane, cum ar fi reducerea nivelului trigliceridelor și a colesterolului din sânge, activitate antiinflamatorie și antitrombotică. Literatura actuală susține ideea conform căreia polenul și păstura sunt surse de acizi grași polinesaturați (MUFAs și PUFAs), acizi grași esențiali pentru nutriția umană. Acizii grași polinesaturați nu pot fi sintetizați în organismul uman și prin urmare trebuie obținuți din alimente. În acest sens, păstura și polenul pot fi considerate o potențială sursă de PUFA în dieta umană (KAPLAN și colab., 2016; MĂRGĂOAN și colab., 2014).

Raportul acizilor nesaturați și saturați reprezintă indice de calitate, iar în cazul păsturii raportul dintre cantitatea acizilor neasaturați și cei nesaturați au fost semnificativ mai mare în probele P4 și P6.

Diferențele mari dintre rezultatele raportate de diverși autori pot fi explicate prin originea botanică diferită.

În ceea ce privește valorile obținute pentru acizii grași, acestea sunt comparabile cu cele din literatură, deși unii autori au raportat un număr mult mai mare de acizi grași existenți în păstură. CEKSTERYTE și JANSEN în 2012 au identificat douăzeci și doi de acizi grași în păstură. Acest studiu a arătat că în păstură predomină acizii grași cu catenă medie (C10-C18) și cu catena lungă (C20-C24). Acizii grași cu catenă medie sunt prezenți într-o cantitate mai mare decât cei cu catenă lungă, lucru observant și în studiul de față. Dintre acizii grași saturați acidul palmitic (C16:0) a fost raportat ca fiind în cea mai mare cantitate (între 20.50 și 26.21 %) la fel ca și în cazul păsturii analizate în această lucrare.

Un studiu interesant este cel al lui KAPLAN și colab., (2016) care a identificat 37 de acizi grași: 20 saturați și 17 nesaturați în probele de păstură din Turcia care au avut origini botanice diferite (*Trifolium pratense*, *Gossypium hirsutum* L, *Castanea sativa*, *Citrus* sp, *Helianthus annuus*), în timp ce ČEKSTERYTĚ și colab., (2008) au studiat acizii grași din păstura lituaniană colectă în primăvară și vară și a identificat doar 22 de acizi grași inclusiv acizi grași polinesaturați: cinci acizi  $\omega$ -3, patru acizi  $\omega$ -6 și trei acizi  $\omega$ -9. În păstura de primăvară, care a avut preponderent polen de *Salix* sp. s-a raportat o cantitate de 45.1%, în timp ce în păstura de vară, cu polen predominant de *Brassica napus* var. *oleifera* s-a raportat o cantitate mult mai mare, și anume 78.7%.

În studiul lui ISIDOROV și colab., (2009) au fost determinați acizii grași din păstură, utilizând extracții succesive cu solvenți organici de diferite polarități. În probele de păstură analizate au fost identificați atât acizi grași nesaturați (acid  $\alpha$ -linoleic, aci linoleic) cât și acizi grași saturați. O cantitate însemnată de acizi alifatici C16–C18 (9%) și esteri ai acestora au fost identificați în extractele realizate cu hexan. În extractele metanolice de păstură s-au identificat cantități mici de acid hexadecenoic, linoleic,  $\alpha$ -linoleic.

O parte importantă a acizilor grași din dietă este acidul  $\alpha$ -linolenic (ALA) care este un acid gras omega-3 și acidul linoleic (LA) care este un acid gras omega-6. Raportul optim dintre acizii grași nesaturați  $\omega$ -6:  $\omega$ -3 din dietă este considerat a fi 1: 2, dar în dieta modernă acest raport este în dezechilibru (1: 15-20). Polenul și păstura reprezintă o sursă de acizi grași nesaturați care ar putea ajuta la restabilirea acestui dezechilibru. Investigații recente asupra acizilor grași din păstura care are origine botanică diferită au arătat că acest produs are un raport echilibrat de  $\omega$ -3 /  $\omega$ -6 care este mai potrivit pentru dieta umană decât multe uleiuri de plante (CEKSTERYTE și JANSEN, 2016). Păstura poate fi folosită ca și supliment alimentar datorită conținutului ridicat de acid linolenic (omega-3) și a unui raport echilibrat de acizi grași  $\omega$ -3 /  $\omega$ -6.

Un aspect important de menționat este acela că acizii grași au proprietăți bactericide și antifungice, jucând un rol important în inhibarea creșterii bacteriilor precum,

*Paenibacillus*, *Melissococcus pluton* și a altor specii bacteriene care pot provoca boli albinelor. Pentru larve și pentru albinele doici acizii grași sunt o importantă sursă de energie. Albinele utilizează lipidele pentru producerea corpului gras pentru iernare și pentru producerea lăptișorului de matcă (MĂRGĂOAN și colab., 2014).

### 4.3.3 Conținutul de polifenoli totali

#### 4.3.3 Total polyphenolic content

Polifenolii constituie un grup semnificativ de substanțe cu diferite proprietăți bioactive, iar în lucrarea de față conținutul total al acestora a fost cuantificat prin metoda spectrofotometrică Folin-Ciocalteu descrisă în capitolul Material și metode. Pentru cunoscerea polifenolilor totali s-au utilizat ecuația de regresie a curbei de calibrare de acid galic:  $y=0.031x-0.0001$ ,  $R^2=0.9996$ .

Cantitatea de polifenoli din extractele etanolice de păstură românească au fost cuprinse între 6.31 mg GAE /g (P14) și 16.12 mg GAE /g (P17), iar în cazul extractelor etanolice de păstură indiană valorile au fost similar 5.67 mg GAE /g (P9) și 15.34 mg GAE /g (P10).

În proba de păstură care a avut polenul predominant de *Eucalyptus sp* (India - iunie 2016), conținutul de polifenoli este diferit față de probele care au avut polen predominant de *Brassica sp*. Aceste informații pot fi utilizate în viitor pentru studii suplimentare în ceea ce privește standardizarea acestei surse florale.

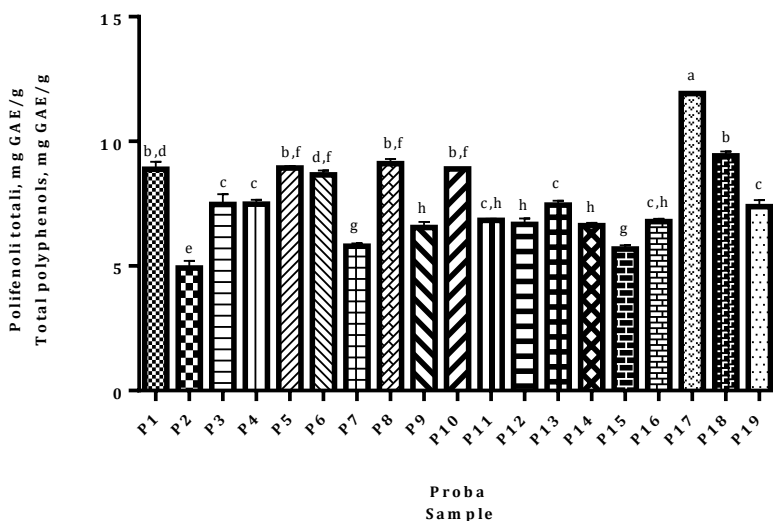


Fig. 22. Variația conținutul total de polifenoli din probele analizate

Fig. 22. Variation of total polyphenoloic content from analyzed samples

Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu, cu privire la conținutului de polifenoli totali ai probelor de păstură au fost similare cu datele obținute de ZULUAGA

și colab., (2015) la păstura recoltată din Columbia, unde conținutul total de polifenoli din păstura columbiană a variat între 2,5 și 13,7 mg GAE / g, dar mai mici decât cele din studiul lui MARKIEWICZ-ZUKOWSKA și colab., (2013), care a raportat conținutul de polifenoli din păstură ca având o medie de 24,60 mg GAE / g.

Conținutul de polifenoli din păstură și polen este cel mai ridicat când aceste produse sunt proaspete (10.1 mg GAE/păstură, 8.2 mg GAE/gpolen). Depozitarea fără răcire reduce semnificativ conținutul acestor compuși (6.37 mg GAE /g păstură, 7.34 mg GAE /g polen) (TAVDIDISHVILI și colab., 2014)

Conținutul de polifenoli totali din extractele de păstură testate este în concordanță și cu alte cercetări ( NAGAI și colab., 2004; ZULUAGA și colab., 2014; SOBRAL și colab. 2017; TOMÁS și colab., 2017). Corelația dintre polifenolii totali și originea botanică nu este realizată în studiile citate mai sus.

În studiul lui Durán și colab., ( 2014) rezultatele indică faptul că în toate probele de păstură analizate, cantitatea de polifenoli variază atât în funcție de tipul de extracție, cât și de originea geografică.

În plus, aceste rezultate coincid cu cele prezentate de CARPES și colab., (2007) care subliniază faptul că totalul compușilor fenolici nu variază numai în funcție de modul de extracție, dar variază și în funcție de originea botanică ceea ce indică o corelație directă cu originea florală. De asemenea, BALTRUŠAITYTE și colab., (2007), indică faptul că polifenoli variază în funcție de originea polenului, care depinde în mod clar de floră și locația geografică a acestuia.

TOMÁS și colab., (2017) a raportat conținutul total de polifenoli, evaluat prin metode spectrofotometrice, între un minim de 14 mg GAE / g păstură și un maxim de 84 mg GAE / g păstură. Aceste valori au fost mai mari decât cele raportate de alți autori (FEAS și colab., 2012) pentru polenul de albine portughez nord-est și pot fi explicate datorită biodisponibilității sporite a compușilor care rezultă din degradarea structurii polenului la fermentarea păsturii în stup, dar după cum am verificat în această lucrare, probabil originea polenului analizat a fost diferită având în vedere o gamă largă de posibilități.

Datele din literatura de specialitate referitoare la conținutul total de polifenoli ai păsturii românești au arătat o variabilitate semnificativă între probele care au în compoziție polen de diferite origini florale. Valorile raportate au variat între 15.33-22.72 mg GAE/g (COCAN și colab., 2009; STANCIU și colab., 2007). Până în prezent există foarte puține studii privind compoziția chimică și compușii bioactivi ai păsturii românești și nici un studiu privind conținutul individual de acizii fenolici.

Din rezultatele obținute este evident că păstura poate concura cu alte surse naturale de polifenoli (BUNEA și colab., 2012; PUGLIESE și colab., 2013).

### 4.3.4 Conținutului total de flavonoide

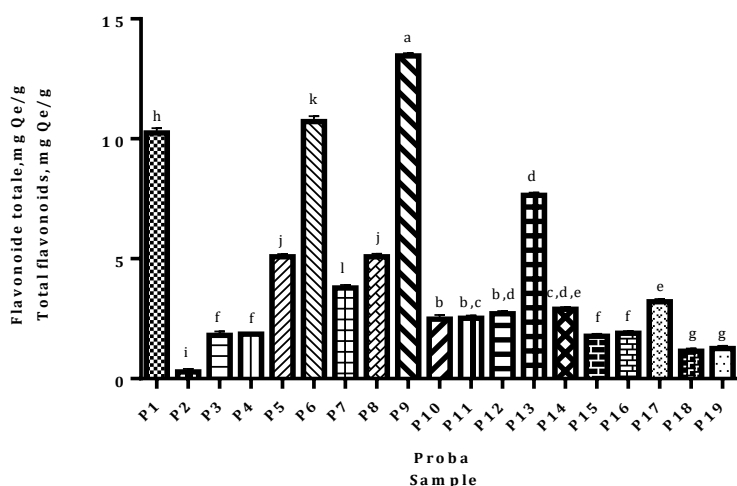
#### 4.3.4 Total flavonoid content

Flavonoidele sunt una dintre principalele grupe de compuși polifenolici întâlniți în păstură (STANCIU și colab., 2016), iar în lucrarea de față conținutul de flavonoide totale a fost determinat prin metoda propusă de MĂRGHITAȘ și colab., 2009 descrisă în capitolul Material și metode. Pentru cunoscerea flavonoidelor totale s-a utilizat ecuația de regresie a curbei de calibrare de quercetină:  $y=0.0003x-0.0048$ ,  $R^2=0.9998$ .

Valori ale flavonoidelor totale au fost cuprinse între 0,22 mg Qe/g păstură (P2) și 13,39 mg Qe/ g păstură (P9), cu o medie de 4,16 mg Qe/ g păstură.

Conținutul de flavonoide totale obținut pentru proba de păstură românească, identificată ca având polen predominant de *Brassica spp.* (97%), a fost de 5,01 mg QE/g, iar pentru proba de păstură echivalentă, din India de 5,02 mg QE/g.

Cea mai mare cantitate de flavonoide, de 13,39 mg Qe/g păstură, a fost identificată în proba P9, această având polenul predominant de *Eucalyptus sp.*



**Fig. 23. Variația conținutului total de flavonoide din probele de păstură analizate**

*Fig. 23. Variation of total flavonoid content from analyzed bee bread samples*

În datele existente în literatură, la fel ca și în acest studiu, cantitatea compușilor flavonoidici variază în limite foarte largi. Conținutul de flavonoide din toate extractele de păstură analizate a fost în concordanță cu rezultatele obținute de ZULUAGA și colab. 2015 care a raportat un conținut total de flavonoide cuprins între 1,9 și 4,5 mg Qe/g. În schimb, în studiul lui MARKIEWICZ-ZUKOWSKA și colab., (2013) conținutul total de flavonoide a variat între 32,72-37,15 mg QE/g, dar din nici unul dintre aceste studii

originea botanică nu a fost discutată. Este de așteptat ca păstura, care este un amestec de polen colectat de albine, să varieze foarte mult în compoziție. Variabila majoră din păstură este compoziția speciei polenului, care variază în funcție de originea botanică sau de sezon.

În ceea ce privește conținutul de flavonoli și de flavone, extracția lor pare să fie influențată și de tipul solventului utilizat, cele mai ridicate valori au fost obținute în cazul extractelor metanolice (0,696 mg QE/g<sup>-1</sup>), urmate de cele etanolice (15,84 mg QE/g<sup>-1</sup>). Extractele apoase conțin cantități mai scăzute de flavonoli și flavone (0,168 mg QE/g<sup>-1</sup>). Cele mai mari cantități de flavanone s-au raportat în extractele metanolice și în cele apoase de păstură (7,86 respectiv 6,04 mg NAE/g<sup>-1</sup>). Cantități reduse ale acestor compuși au fost determinate în cazul extractelor etanol-apă (3,12 mg NAE/g<sup>-1</sup>) (COCAN și colab., 2009).

Valori ale flavonelor cuprinse între 0.66 și 0.98 mg QE/g păstură a raportat și BOBIȘ și colab., (2017) pentru păstura românească în timp ce pentru flavanone și dihidroflavonoli valorile raportate au fost mai ridicate și anume 7.86 și 9.64 mg NAE/g păstură. În cazul păsturii indiene aceeași autoare a raportat valori mai mari și anume 0.89 -1.09 mg QE/ g păstură pentru flavone, respectiv 10.66 -12.64 mg NAE/g păstură pentru flavanone și dihidroflavonoli.

Conținutul mai scăzut de flavone a fost raportat și de TOMÁS și colab., (2017), conținutul acestora variind în păstura portugheză între 1 și 7 mgQE/g pentru flavone/flavonoli și, respectiv, 10 până la 89 mg QE/g de extract pentru flavanone/di-hidroflavonoli.

IVANIŠOVÁ și colab., (2015) a identificat pentru flavonoidele totale, folosind metoda cu clorura de aluminiu, valori cuprinse între 13.56 to 18.24 μg QE/g<sup>-1</sup>.

În general, este foarte dificil să se determine conținutul exact de flavonoide totale din păstură, deoarece vorbim de o matrice extrem de complexă (cu un conținut ridicat de proteine, glucide și lipide), iar flavonoidele cel mai adesea se găsesc sub formă glicozidică în polenul de albine. Pentru cuantificarea flavonoidelor în literatura de specialitate se întâlnesc diferite metode, iar pentru exprimarea conținutului lor, se folosesc de asemenea diferite standarde pentru trasarea curbelor de calibrare. Dintre acestea cele mai folosite sunt quercetina și naringina, dar și rutina, catechina și epicatechina. Aceste flavonoide au absorbantă diferită și e normal ca citirea să se facă la lungimi de undă diferite, și implicit rezultatele să fie diferite ca valoare.

#### **4.3.5 Identificarea compușilor fenolici individuali**

##### **4.3.5 Identification of individual phenolic compounds**

În cadrul acestei lucrări, o metodologie dezvoltată anterior pentru identificarea originii botanice a polenului de albine (CAMPOS și colab., 1997) a fost aplicată probelor de păstură, cu obiectivul final de a identifica principalele flavonoide și acizi fenolici, pentru a furniza mai multe date despre acest material brut. În general, abordarea prin

intermediul profilelor cromatografice a flavonoidelor și a compușilor fenolici sa dovedit a fi mult mai precisă și mai informativă față de microscopia optică.

Tehnica HPLC/DAD s-a dovedit a fi convenabilă pentru identificarea originii botanice a probelor analizate și utilă în caracterizarea constituenților predominanți ai acestuia. Prin gradientul utilizat, eluția compușilor fenolici cu timpi de retenție între 25 și 60 de minute a permis imediat determinarea tipului de compus fenolic. Cromatogramele obținute au fost înregistrate în domeniul lungimii de undă cuprinse între 250 și 380 nm. Pentru identificarea compușilor polifenolici au fost analizate individual spectrele care au compus cromatogramele. Fiecare compus polifenolic are un spectru de absorbție caracteristic ca formă și ca și număr de maxime (picuri de absorbție). De asemenea raportul între intensitatea acestor picuri este caracteristică pentru fiecare compus.

Pentru o identificare corectă a compușilor polifenolici s-au comparat spectrele obținute cu spectrele compușilor de referință (standarde) existenți în profilotecă precum și cu cele prezentate de către CAMPOS și MARKHAM (2007). Timpii de retenție însoțiți de spectrele de absorbție în ultraviolet constituie date precise pentru identificarea compușilor fenolici.

Detectarea picurilor, în cromatogramele probelor de păstură analizate, între 260 și 340 nm a însemnat existența flavonoidelor (flavone și flavonoli) și a unor derivați ai acidului cinamic. În cazul probelor monoflore aceste cromatograme au fost suficiente pentru a distinge specie de polen, după ce a fost comparat cu referințele din baza de date existentă. Astfel, flavonoidele, deja recunoscute ca și markeri biochimici ai plantelor în general (TOMAS-BARBERAN și colab., 1988), sunt utilizate aici ca și markeri ai speciilor florale care corespund probelor studiate.

Extracția compușilor fenolici constituenți ai păsturii și anume utilizarea etanolului 50% a permis extragerea întregii game de compuși de interes (flavonoide libere, flavonoide heterozidate, acizi fenolici etc atât compuși polar cât și nepolari). Aceștia sunt reprezentați pe aceeași cromatogramă, chiar dacă nu în concentrațiile lor totale, permițând astfel o mai bună comparare și analiză a porbei în cauză. La sfârșitul cromatogramei eluează compușii cei mai nepolari și cu masa moleculară cea mai mare, iar la începutul cromatogramei eluează compușii cu polaritatea cea mai mare și cu masa moleculară mai mică.

Analiza HPLC/DAD a permis determinarea speciilor de plante prezente în probele de păstură analizate cu ajutorul profilelor cromatografice și al spectrelor UV obținute în timpul screening-ului, care sugerează subclasa de flavonoide analizată. Diferite profile fenolice și polifenolice au fost obținute în urma analizării extractelor.

Teoria dezvoltată de către (CAMPOS ȘI MARKHAM, 2007) a fost de mare importanță pentru prima abordare identificării flavonoide și acizilor fenolici existenți în probele studiate.

Rezultatele obținute în urma analizării probelor de păstură sunt în concordanță cu rezultatele prezentate anterior pentru păstură și polen (BALTRUŠAITYTE și colab.,

2007; MARKIEWICZ-ZUKOWSKA și colab., 2013; SOBRAL și colab., 2017; TAVDIDISHVILI și colab., 2014). Datele spectrale pentru toate probele au fost citite în intervalul 220-400 nm. Identificarea structurală a fost făcută în conformitate cu CAMPOS și MARKHAM, (2007).

Comparând rezultatele obținute cu cele obținute la analiza polenului colectat manual, direct de pe planta și cu polenul colectat de către albine, datele rămân aceleași.

Profilele polifenolice obținute prin analiză HPLC/DAD nu au fost afectate de proteinele și polizaharidele prezente în probele de păstură analizate. În cazul probelor analizate compușii fenolici care au eluat au dat timpi de retenție (RT) cuprinși între 30 și 55 min.

Toate flavonoidele identificate în probele de păstură sunt flavone sau derivate ale flavonelor. Aceste flavonoide atunci când sunt legate de glucide apar sub formă de *O*-glicozide. În ceea ce privește polifenolii identificați aceștia sunt predominant derivați ai acidului hidroxicinamic.

Având în vedere afirmațiile din paragraful anterior, cuantificarea a fost făcută cu ajutorul a trei standarde, după următoarea schemă:

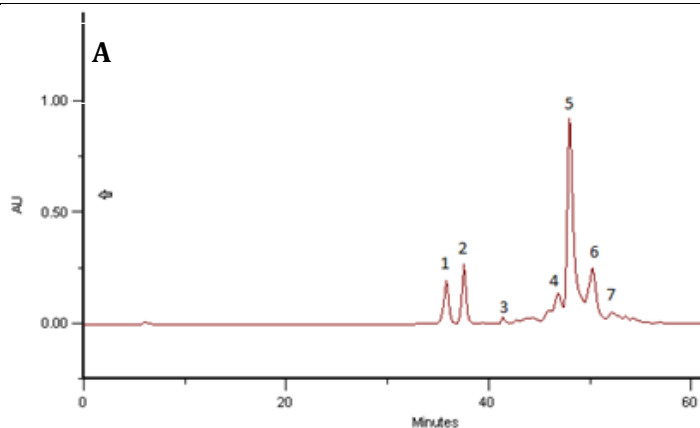
- Dozarea în echivalenți gram de rutină (curbă standard pentru rutină concentrații între 0,0005-0,03 mg/ml) pentru mono- și di- *O*-glicozide;  $y=3E+10x+3E+06$ ;  $R^2=0.9998$ ;
- Dozarea în echivalenți gram de quercetină (curbă standard pentru quercetină concentrații între 0,0005- 0,04 mg/ml) pentru aglicone;  $y=2E+10x-2E+06$ ;  $R^2=0.9996$ ;
- Dozarea în echivalenți gram de acid hidroxicinamic (curba standard pentru acidul hidroxicinamic, concentrații între 0,0005- 0,04 mg/ml) pentru derivații acidului hidroxicinamic  $y=7E+10x+4E+07$ ;  $R^2=0.9997$ .

Datele obținute pentru fiecare compus fenolic nu corespund unui randament de extracție exhaustiv, ci mai degrabă ceea ce rezultă din cuantificarea aplicată metodologiei urmate așa cum sa explicat mai sus. În orice caz, valorile sunt foarte apropiate de cele care ar fi obținute în cazul cuantificării a unor extracte cu randament total (aproape de 100%) și dau o idee asupra componenților fenolici existenți în păstură și a cantității lor relative.

Profilele fenolice obținute au fost simple, compuse din flavonoli, flavone și derivați ai acidului hidroxicinamic (Fig. 24-29).

În figurile 24 și 25 este prezentat profilul HPLC / DAD al păsturii din România colectată în iulie 2016 și din India, colectată în iunie 2016, ambele având în componență polen de *Brassica* sp ca și principal taxon (< 97%). Spectrele UV ale compușilor 1 și 2 corespund flavonolilor glicozidați la carbonul C3 și sunt ambii derivați ai 3-*o*-Kaempferol. Toți ceilalți compuși sunt derivați ai acidului hidroxicinamic (date în conformitate cu CAMPOS ȘI MARKHAM, 2007) cu o probabilitate mare de structuri polimerizate cum ar fi poliamide de spermidină.

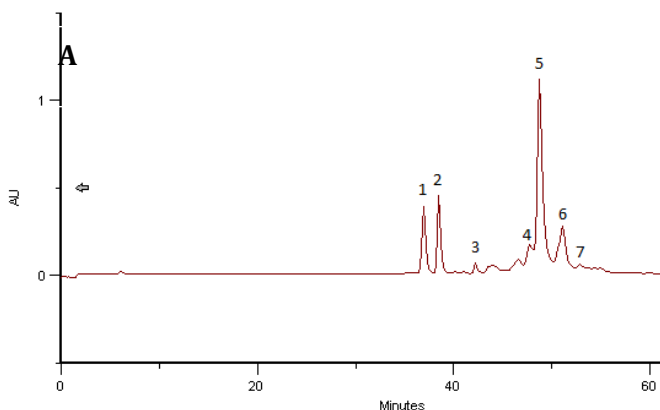




**Fig. 24. (A) -Profilul HPLC/DAD al probei de păstură românească (P5) de *Brassica napus* L.**  
 Fig.24. (A) HPLC/DAD profile of Romanian bee bread, corresponding to 97% of *Brassica napus* L. pollen as taxon origin

**Tabelul 10 (Table 10) *Compușii fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P5***  
*Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P5*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignment based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	35.83	Kamferol-3-O- glicozid	2.68
2	37.64	Kamferol-3-O- glicozid	2.33
3	42.11	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.04
4	47.61	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.80
5	48.69	Derivat al acidului hidroxicinamic	5.59
6	50.99	Derivat al acidului hidroxicinamic	1.77
7	54.82	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.10



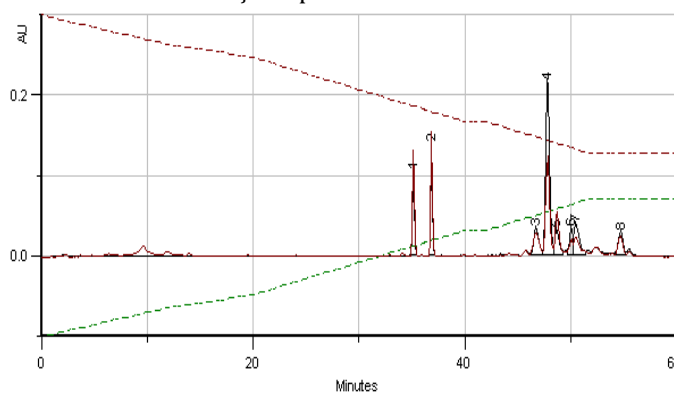
**Fig. 25. (A) -Profilul HPLC/DAD al probei de păstură din India (P8) de *Brassica napus* L.**  
 Fig . 25. (A) HPLC/DAD profile of Indian bee bread, corresponding to 97% of *Brassica napus* L. pollen as taxon origin

Concentrațiile compușilor identificați sunt prezentate în tabelul de mai jos.

Tabelul 11 (Table 11) **Compușii fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P8**  
*Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P8*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignment based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	35.83	Kamferol-3-O- glicozid	2.57
2	37.64	Kamferol-3-O- glicozid	2.21
3	42.19	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.03
4	47.74	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.58
5	48.72	Derivat al acidului hidroxicinamic	5.61
6	51.08	Derivat al acidului hidroxicinamic	1.62
7	54.94	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.08

După cum se poate observa și în figura 26 există o similitudine uriașă între profilul HPLC/DAD al compușilor polifenolici din probele de polen de rapiță colectat manual, direct de pe plante provenite din Slovacia și profilurile probelor de păstură din România și India colectate în iulie și respectiv iunie 2016.



**Fig. 26. Profilul HPLC/DAD al unei probe de polen de rapiță pur (*Brassica napus* L.) (această analiză a fost realizată cu polen de rapiță din Slovacia). Profilul HPLC/DAD și spectrele UV sunt identice cu cele prezentate în fig. 24 și 25**

Fig. 26. HPLC/DAD profile of pure rape pollen (*Brassica napus* L.) sample (these analyses were carried out with pollen from Slovakia). The profile is identical and the UV – spectra of each compound have the similar correspondence as presented in fig. 24 and 25.

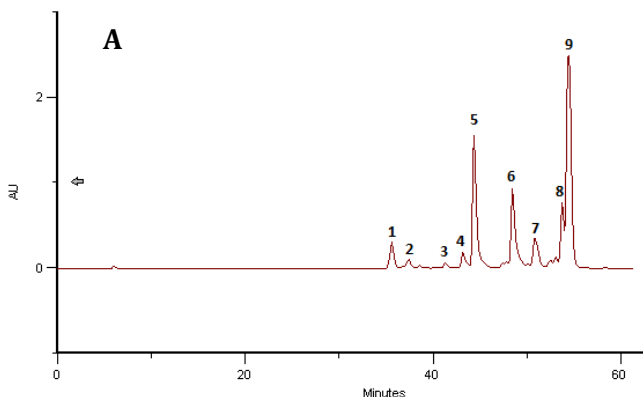
(WANG și colab., 2018) a identificat în polenul de rapiță trei flavonoide inclusiv quercetină-3-O-(2''-O-glucopiranosil)-glucopiranoside (în cantități mici), quercetină-3-O-(2''-O-glucopiranozil)-rhamnopiranozid și kaempferol-3-O-(2''-O-glucopiranozil)-glucopiranozid.

De asemenea, în acest studiu s-a identificat N', N''-di-p-coumaroilspemidine în extractul de polen de rapiță crud, utilizând metoda HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. Acești

compuși sunt poliamine inclusiv acidul hidroxicinamic și acidul p-cumaric legat de atomul de azot al spermidinei.

În cazul analizei UV numai structura acidului fenolic este responsabilă pentru absorbție și pentru spectrele obținute. Profilul nu este similar cu cel prezentat în această lucrare deoarece metodologia aplicată a fost diferită. Polenul de rapiță suferă un "tratament de rupere a peretelui" și ulterior a fost extras cu etanol 75% (extracție solid/lichid). Autorii, de asemenea, purifică cu eter de petrol probele pentru a elimina impuritățile liposolubile și, în final, spală cu n-butanol saturat cu apă. Cu toate acestea, rezultatele obținute prin HPLC-ESI-QTOF-MS / MS spectrele MS ale celor trei flavonoli, nu corespund cu spectrele identificate în această lucrare.

Similitudinea acestor amprentelor polifenolice a făcut posibilă identificarea probelor de păstură pe baza profilului HPLC/DAD așa cum a fost propus anterior pentru polenul de albine de către CAMPOS și colab., (1997). În această lucrare s-a încercat pentru prima data identificarea originii botanice a păsturii cu ajutorul amprentei polifenolice lucru realizat anterior doar pentru polenul de albine.



**Fig. 27. (A) -Profilul HPLC/DAD al probei de păstură indiană (P9) de *Eucalyptus* sp. (91%)**

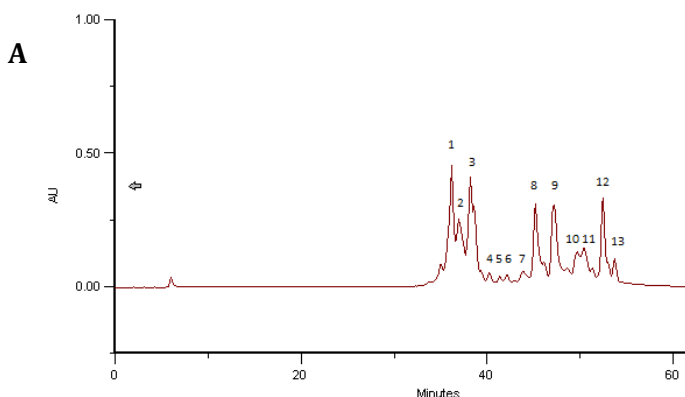
Fig.27. (A) HPLC/DAD profile of Romanian bee bread, corresponding to *Eucalyptus* sp. (91%) of pollen as taxon origin

**Tabelul 12 (Table 12) Compușii fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P9**  
*Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P9*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignment based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	35.61	Quercetină-3- <i>O</i> - sophorosid	2.40
2	37.42	Kamferol-3- <i>O</i> - glicozid	0.86
3	38.55	Herbacetină-3- <i>O</i> - glicozid	0.35
4	41.3	Mircetină	0.44
5	43.18	Tricetină	2.33
6	44.35	Luteolină	6.98
7	50.84	Derivat al acidului hidroxicinamic	2.00
8	53.77	Derivat al acidului hidroxicinamic	3.11
9	54.44	Derivat al acidului hidroxicinamic	9.35

În figura 27, profilul HPLC/DAD corespunde polenului de *Eucalyptus sp.* și prezintă flavonoidele caracteristice acestei specii florale: doi flavonoli quercetina 3-O soforozidă (compusul 1) și myricitina (compusul 4) și două flavone, tricetina (compusul 5) și luteolina (compusul 6). Tricetina este un biomarker pentru *Myrtaceae* (CAMPOS și colab., 2002). Derivații de kaempferol (compușii 2 și 3) ar putea provenii de la polenul de *Citrus* care mai este prezent în proba de păstură P9.

În contrast cu profilele HPLC/DAD prezentate mai sus și care erau specifice speciei florale (cazul probelor monoflore și cele care în componență un polen predominant dintr-o anumită specie), în figura 28 este prezentat profilul HPLC/DAD al probei de păstură colectate în Aprilie 2016, P6 care corespunde unu amestec complex de *Salicaceae* – *Salix sp.* (61%), *Rosaceae* – *Prunus sp.* (26%) and *Fagaceae* – *Quercus sp.* (13%). Spectrul UV corespunde cu cel al 8-metilherbacetină-3-O-glicozidată (Compusul 1), quercetină-3-O-glicozidată (Compusul 2), Kaempferol-3-O-glicozidat (Compusul 3), compusul 4 și 5 = 7, 8-metilherbacetină-3-O-glicozidată (MARKHAM și CAMPOS, 1996). Compușii ceilalți sunt derivați ai acidului cinamic (date în conformitate cu CAMPOS și MARKHAM, 2007). În acest caz nu s-a putut găsi o corespondență corectă între profilul obținut și proveniența polenului cu, deoarece, de fapt, aceasta nu există. Pentru proba de păstură Iunie 2016, prezentată în figura 29, corespondența a fost și mai dificilă din motivele amintite mai sus.



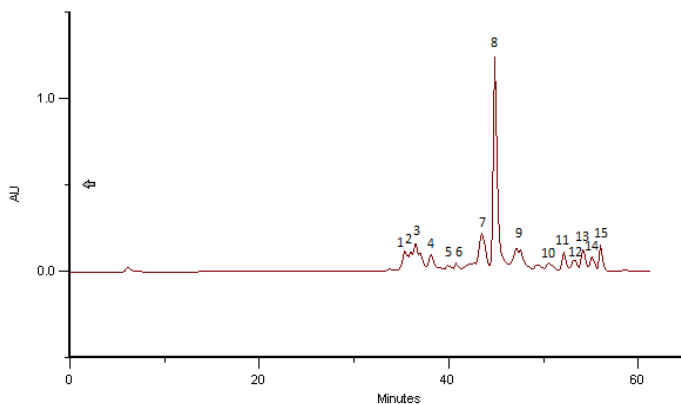
**Fig. 28. (A) -Profilul HPLC/DAD al probei de păstură românească (P6) de *Salicaceae* – *Salix sp.* (61%), *Rosaceae* – *Prunus sp.* (26%), *Fagaceae* – *Quercus sp.* (13%)**

Fig. 28. (A) HPLC/DAD profile of BB- Romania (P6) that correspond to *Salicaceae* – *Salix sp.* (61%), *Rosaceae* – *Prunus sp.* (26%), *Fagaceae* – *Quercus sp.* (13%)

Tabelul 13 (Table 13)

**Compuși fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P6**  
*Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P6*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignment based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	36.27	Herbacetină-3- <i>O</i> - glicozid	4.30
2	36.98	Quercetină-3- <i>O</i> - glicozid	2.98
3	38.38	Kamferol-3- <i>O</i> - glicozid	2.85
4	40.36	Herbacetină-3- <i>O</i> - glicozid	0.43
5	42.17	Herbacetină-3- <i>O</i> - glicozid	0.27
6	43.87	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.25
7	45.17	Derivat al acidului hidroxicinamic	1.31
8	47.10	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.80
9	47.21	Derivat al acidului hidroxicinamic	1.18
10	49.61	Derivat al acidului hidroxicinamic	1.94
11	50.75	Derivat al acidului hidroxicinamic	1.74
12	52.42	Derivat al acidului hidroxicinamic	4.64
13	53.68	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.43



**Fig. 29. (A) -Profilul HPLC/DAD al probei de păstură românească (P7) de Fabaceae – Trifolium (34.6%), Tiliaceae – Tilia sp. (22%), Fabaceae (13%), Rosaceae (7.5%), Plantaginaceae – Plantago (5%), Fabaceae – Lotus (7.5%), Asteraceae – Taraxacum officinale (3%), Asteraceae (3%), Lamiaceae (2.9%), Asteraceae – Centaurea montana (1.5%)**

Fig. 29. –(A) HPLC/DAD profile of BB– Romania, (P7) that correspond to Fabaceae – Trifolium (34.6%), Tiliaceae – Tilia sp. (22%), Fabaceae (13%), Rosaceae (7.5%), Plantaginaceae – Plantago (5%), Fabaceae – Lotus (7.5%), Asteraceae – Taraxacum officinale (3%), Asteraceae (3%), Lamiaceae (2.9%), Asteraceae – Centaurea montana (1.5%)

Tabelul 14 (Table 14) **Compușii fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P7**  
*Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P7*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignment based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	35.73	Kamferol-3-O- glicozid	0.90
2	36.48	Quercetină-3-O- glicozid	1.08
3	38.13	Quercetină-3-O- glicozid	0.81
4	40.81	Isoramnethină-3-O- glicozid	0.91
5	43.48	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.61
6	44.85	Derivat al acidului hidroxicinamic	1.72
7	45.62	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.28
8	47.10	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.27
9	47.57	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.24
10	49.24	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.17
11	50.52	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.26
12	52.11	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.53
13	53.16	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.33
14	54.24	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.49
15	55.10	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.44

După cum sa arătat mai sus, prin analiza a diferite probe de păstură din România și India, s-au obținut profiluri polifenolice diferite. În primul rând, s-au comparat probele între ele, iar apoi s-au comparat cu probe de polen de plante colectat manual (și cu rezultatele unor analize care aparțin bazei de date a laboratorului de Farmacognozie al Facultății de Farmacie, Universitatea din Coimbra, Portugalia, unele dintre ele deja publicate, de exemplu (CAMPOS și colab., 1997; CAMPOS și colab., 2015; NEGRI și colab., 2018). Probele de păstură analizate (probe colectate în România în iulie 2016 și India în iunie 2016) au fost aproape pure în ceea ce privește taxonul.

Aceste probe conțin aproape integral polen de la *Brassica napus L.*, 97% păstura din România, respectiv 98% păstura din India. Pentru a confirma originea botanică a păsturii, au fost efectuate analize palinologice, precum și analizele HPLC / DAD ale polenului floral colectat direct de la plante de *Brassica* din Portugalia.

Au fost analizate probele de păstură care au avut polen majoritar de *Brassica* (> 90%), precum și polenul colectat direct de la plante din familia *Brassicaceae*. În plus, sa făcut o încercare de a demonstra, prin comparații ale profilului cromatografic al polenului vegetal natural, al polenului de albine și a păsturii, dacă saliva albinelor și fermentarea polenului afectează în vreun fel compoziția flavonoidelor prin acțiunea enzimatică. Din datele obținute, profilul a fost menținut în toate cele trei matrici, din România, India și chiar din Slovacia. Profile similare HPLC / DAD au fost obținute pentru probe de polen de albine din Sultanatul Oman în 2010 și din Brazilia în 2012 (datele nu sunt prezentate).

În probele analizate de păstură de *Brassica sp.*, au fost identificați cinci derivați ai acidului hidroxicinamic și două flavonoide derivate ale 3-O-Kamferolului. Analiza cantitativă a fost efectuată pe baza curbelor de calibrare trasate pentru substanțele de referință: acid hidroxicinamic ( $R^2 = 0.997$ ), quercetină ( $R^2 = 0.996$ ) și rutină ( $R^2 = 0.998$ ).

Pentru toate curbele de calibrare,  $p$  a fost mai mic de 0,001 ( $p < 0,001$ ). Conținutul compușilor măsurat în extractele de păstură este prezentat în cele ce urmează.

Derivații acidului hidroxicinamic au fost prezenți în aceste probe în cele mai mari cantități, în timp ce flavonoidele cum ar fi kamferolul-3-O-glicozidic, au fost prezenți într-o proporție mai mică. Proprietățile antioxidante puternice ale derivaților acidului hidroxicinamic au fost descrise de SILVA și colab., (2000), iar pentru aceste probe potențialul este similar. Proporția celor două flavonoide în cele două probe de *Brassica* a fost similară, coroborată cu identificarea aceluiași taxon.

În cadrul acestei lucrări s-a raportat pentru prima dată că acest profil fenolic rămâne neschimbat în cazul polenului floral (colectat manual), al polenului de albine și al păsturii. În ciuda transformărilor biochimice care apar în timpul fermentației păsturii, se pare că acești compuși fenolici nu sunt afectați și rămân neschimbați. De asemenea, variabile precum solul, clima nu par să influențeze acești compuși în cazul probelor studiate.

A fost demonstrat că polenul acumulează o clasă specifică de flavonoide (TOMAS-LORENTE și colab., 1992) și utilizând metoda HPLC/DAD, CAMPOS și colab., (1997) a arătat că fiecare specie studiată a dat o amprentă polifenolică unică (flavonoide plus alți compuși fenolici cum ar fi derivații acidului hidroxicinamic). Flavonoidele sunt recunoscute pe scară largă ca fiind markeri chimotaxonomici de încredere pentru plante (HARBORNE și TURNER, 1984). Dovezile obținute de CAMPOS și colab., (1997) sugerează că acest lucru este de asemenea valabil și pentru flavonoidele din polen. S-a constatat că polenul de la *Ulex europaeus* din Bay of Plenty (Noua Zeelandă) a avut același profil ca și cel al plantelor de *Ulex europaeus* care cresc în Lower Hutt (Noua Zeelandă), la 400 km și chiar și cu al plantelor de *Ulex europaeus* care cresc în Portugalia. Aceeași situație a fost raportată și pentru *Eucalyptus globulus* când analiza de polenului de la arbori din diferite zone geografice a prezentat un profil fenolic identic. Profilele polifenolice obținute din extractele de polen sunt tipizate prin prezența flavonoidelor sub formă glicozidată, în principal quercetină, kaempferol, izorhamnetină și/sau miricetină (CAMPOS și colab., 1997).

Este bine cunoscut faptul că, compoziția fenolică a diferitelor specii botanice depinde de chemotipul plantei și de diverși factori de mediu; prin urmare, ar fi rezonabil să se afirme că compoziția fenolică a păsturii depinde de originea ei florală (BALTRUŠAITYTE și colab., 2007). Autorii au raportat că șapte probe de păstură, din cele nouă testate, conțineau cantități semnificative de acid p-cumaric. Păstura conținea, de asemenea, o cantitate mai mare de kaempferol decât mierea, în schimb, crizina și apigenina au fost prezente doar sub formă de urme în probele testate. Rezultatele raportate arată clar că ariile picurilor din cromatogramele HPLC ale compușilor fenolici detectați în extractele de miere și păstură au variat într-o gamă foarte largă.

De fapt, conținutul în compuși fenolici ai păsturii a fost foarte puțin studiat și a fost raportat doar de câțiva autori care au folosit diferite metode de identificare și cuantificare (DURÁN și colab., 2014; ISIDOROV și colab., 2009; MARKIEWICZ-

ZUKOWSKA și colab., 2013). Cea mai mare parte a literaturii existente menționează doar fenolii totali cuantificați prin metoda colorimetrică Folin-Ciocalteu (DURÁN și colab., 2014; ZULUAGA și colab., 2015) și nu oferă o caracterizare detaliată în ceea ce privește compuşii fenolici individuali. Câteva studii pe păstura din Polonia, Georgia și Portugalia au identificat anumiți compuși fenolici individuali, dar toate au folosit abordări analitice diferite. Primul care a prezentat date privind compoziția biochimică a păsturii a fost ISIDOROV și colab., (2009). În acest studiu sa folosit metoda GC-MS și s-au identificat șase flavonoide (crizină, naringenină, kaempferol, izorhamnetină și apigenin) și patru acizi fenolici (acidul 4-hidroxibenzoic, acidul p-cumaric, ferulic și cafeic). MARKIEWICZ-ZUKOWSKA și colab., (2013) au identificat, folosind tot metoda GC-MS, kaempferol și apigenină. TAVDIDISHVILI și colab., (2014) au raportat prezența a trei flavonoide: naringină, rutină și quercetină, în probe de păstură giorgiene, utilizând HPLC-UV-VIS. Rutina [quercetină-3-O-ramnozil (1-6) glucosid] este adesea confundată cu quercetina-3-O-ramnozil (1-2) glucosid. Prin metode cromatografice, este imposibil să se determine configurația glucidelor care se leagă de flavonoide. După cum a fost publicat anterior, situsurile principale unde se leagă zaharurile de flavonoide în cazul polenului este la poziția 1-2 (MARKHAM AND CAMPOS, 1996).

SOBRAL și colab., (2017) au identificat în păstura portugheză 32 de flavonoide diferite utilizând HPLC-DAD-ESI/MS. Principalii compuși fenolici identificați sunt derivații ai flavonolilor, în principal quercetină, kaempferol, miricetină, isorhamnetină și herbacetină sub formă glicozidată. Autorii au raportat mai mulți compuși care au fost clasificați ca rutinozide, în ciuda situației citate mai sus. În toate probele studiate au fost găsite quercetină-3-O-rutinozidă, kaempferol-3-O-rutinozidă, quercetină-3-O-glucosid, în timp ce miricetina-3-O-glucosid, izoramnetina-3-O-rutinozidă și izoramnetina-3-O-glucosid au fost detectați numai în unele probe de păstură. În acest studiu, toți acești compuși au fost identificați în funcție de caracteristicile lor de retenție, masă și caracteristicile UV-VIS în comparație cu standardele comerciale. Încă o dată, utilizând această metodologie este imposibil să clasifici tipul de glucid care este legat de un flavonoid. Este corect să se afirme că acești compuși au avut ramnoză și glucoză ca fragment glicozidic, dar nu să fie clasificați ca rutinoză [ramnozil (1-6) glucosidă], deoarece în acest caz legătura 1-6 este implicită.

Preferințele în ceea ce privește hrana albinelor sunt încă discutate, iar studii recente indică faptul că albinele preferă dietele care reflectă raportul adecvat al nutrienților necesari pentru supraviețuirea optimă și homeostază. Calitatea nutrițională a polenului, în principal legată de conținutul de proteine și de aminoacizi, este doar unul dintre principalii factori de influență, fiind incluse și alte substanțe non-nutriționale, cum ar fi disponibilitatea resurselor din plante, culoarea, mirosul și morfologia florii (CORBY-HARRIS și colab., 2018). De fapt, albinele colectează și consumă polen și substanțe asemănătoare polenului, cu o valoare nutritivă mică sau deloc nutritive (BAUM și colab., 2004). Conform studiului realizat de CARPES și colab., (2009) polenul colectat de albine conține, în general, cantități caracteristice de polifenoli totali datorită



originii sale botanice și geografice. Flavonoidele sunt compuși minori, dar de mare importanță în polenul de albine și implicit și în păstură. Acești compuși influențează aspectul vizual al granulei de polen (pigmentarea) și gustul (gustul astringent și amar) (DEGRANDI-HOFFMAN și colab., 2015). Cele mai frecvente flavonoide găsite în polenul de albine sunt flavonele și flavonolii care apar aproape exclusiv ca și glicozide. Agliconele sunt structuri simple, cum ar fi kaempferol sau quercetină, dar modelele lor de glicozilare sunt mai complexe decât cele găsite în părțile plantelor (EREL, 2004), așa cum am discutat mai sus.

Tabelul 15 (Table 15)

**Compuși fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P1**  
*Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P1*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignment based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	36.96	Herbacetină-3-O-glicozid	0,48
2	38.18	Kamferol-3-O-glicozid	0,84
3	45.48	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,54
4	46.48	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,03
5	47.65	Derivat al acidului hidroxicinamic	2,16
6	48.32	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,45
7	50.10	Derivat al acidului hidroxicinamic	2,62
8	51.18	Derivat al acidului hidroxicinamic	2,08
9	51.65	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,89
10	52.85	Derivat al acidului hidroxicinamic	2,60

În proba de păstură din aprilie 2016 alcătuită dintr-un amestec de polen de *Rosaceae- Prunus sp.* (>45%) *Salicaceae- Salix sp.*, *Fagaceae- Quercus* s-au identificat două flavonoide sub formă glicozidică, restul compușilor fiind derivați ai acidului hidroxicinamic. Picul majoritar, de la minutul 50.10, a fost asociat derivaților acidului hidroxicinamic. Identificarea s-a realizat pe baza comparației spectrelor de absorbție ale compușilor prezenți în probă cu spectrele compușilor de referință CAMPOS și MARKHAM, 2007.

Tabelul 16 (Table 16) **Compuși fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P2**  
*Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P2*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignment based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	35.94	Herbacetină-3-O-glicozid	0,07
2	36.37	Quercetină-3-O-glicozid	0,14
3	43.67	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,14
4	44.97	Derivat al acidului hidroxicinamic	2,46
5	47.20	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,49
6	47.80	Derivat al acidului hidroxicinamic	Urme
7	49.50	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,30
8	50.78	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,25
9	55.43	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,34

10	53.56	Derivat al acidului hidroxicinamic	Urme
11	54.58	Derivat al acidului hidroxicinamic	Urme
12	55.47	Derivat al acidului hidroxicinamic	Urme
13	56.42	Derivat al acidului hidroxicinamic	Urme

În proba P2 alcătuită dintr-un amestec de polen de *Fabaceae* - *Lotus corniculatus*, *Trifolium sp.*, *Asteraceae* - *Centaurea sp.*, *Taraxacum sp.*, *Lamiaceae*, *Plantaginaceae* - *Plantago sp.*, *Apiaceae* s-au identificat doar două flavonoide sub forma glicozidică, dar au fost în concentrații foarte mici, herbacetina și quercetina. Restul compușilor aparținând derivaților acidului hidroxicinamic. Picul majoritar a fost reprezentat de un derivat al acidului cinamic și a eluat la minutul 44.97.

Această probă a înregistrat cele mai mici concentrații ale compușilor fenolici dintre toate cele analizate.

Tabelul 17 (Table 17) **Compușii fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P3**  
Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P3

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignment based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	36.15	Herbacetina-3-O-glicozid	1,49
2	37.17	Quercetina-3,6-O-glicozid	0,22
3	43.72	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,53
4	45.02	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,87
5	47.21	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,45
6	47.79	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,23
7	49.55	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,65
8	50.76	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,50
9	52.42	Derivat al acidului hidroxicinamic	2,42
10	53.51	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,53
11	54.62	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,61
12	55.49	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,62
13	56.42	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,99

Profilul cromatografic al compușilor polifenolici din proba de păstură P3 care are în componență un amestec de polen de *Salicaceae* - *Salix sp.*, *Asteraceae* - *Bellis perennis*, *Fabaceae* - *Trifolium sp.*, *Rosaceae*, *Prunus sp.*, *Boraginaceae* - *Phacelia tanacetifolia*, *Asteraceae* - *Cirsium arvense*, *Taraxacum sp.*, *Apiaceae*, este constituit dintr-un derivat al herbacetinei și un derivat al quercetinei și din derivați ai acidului cinamic. Observând spectrele UV ale compușilor s-a putut realiza comparația cu spectrele compușilor de referință și astfel identificarea claselor de compuși din care fac parte compușii identificați în probă conform CAMPOS și MARKHAM, 2007.

Tabelul 18 (Table 18) **Compușii fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P4**  
*Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P4*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignment based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	36.02	Herbacetină-3- <i>O</i> -glicozid	0,49
2	37.75	Kamferol-3- <i>O</i> -glicozid	0,48
3	38.39	Kamferol-3- <i>O</i> -glicozid	0,84
4	44.38	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,29
5	45.37	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,56
6	48.35	Derivat al acidului hidroxicinamic	2,44
7	49.77	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,86
8	50.78	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,37
9	52.73	Derivat al acidului hidroxicinamic	3,47
10	54.01	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,11

Proba de păstură P4 a avut în componență un amestec de polen de *Brassicaceae-Brassica sp.*, *Asteraceae - Centaurea sp.*, *Centaurea cyanus*, *Rosaceae- Rubus sp.*, *Salicaceae - Salix sp.*, *Fagaceae - Quercus sp.*, *Apiaceae*, *Rosaceae*, *Fabaceae -Vicia sp.*, (conform tabelului 5). În această probă au fost identificați trei compuși din clasa flavonoidelor, sub forma glicozidică, herbacetina și kaempferolul. Restul compușilor prezenți în probă fiind reprezentați de derivați ai acidului cinnamic. Această încadrare s-a realizat pe baza similitudinilor spectrului UV al compusului cu spectrul acidului cinamic care la rândul său este un derivat al acidului p-cumaric. Identificarea și încadrare compușilor prezenți în această probă s-a realizat prin compararea cu spectrele de referință conform CAMPOS și MARKHAM, 2007.

Tabelul 19 (Table 19) **Compușii fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P10**  
*Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P10*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignment based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	36.54	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,37
2	38.70	Isoramnethină-3- <i>O</i> -glicozid	0,70
3	44.47	Tricetină	0,32
4	47.85	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,24
5	49.84	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,36
6	50.84	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,35
7	53.07	Derivat al acidului hidroxicinamic	3,82

În cazul probei P10 profilul cromatografic a fost compus din șapte picuri. Picul majoritar a fost reprezentat de un derivat al acidului cinamic. În ceea ce privește conținutul de flavonoide în aceasta probă s-a identificat un flavonol sub formă glicozidică și anume isoramnethina -3-*O*-glicozid și o flavonă- tricetina (aglicozidică). Aceasta combinație este destul de rar raportată în literatură ca fiind prezentă în polenul apicol sau cel al plantelor, iar tricetina este un biomarker al *Myrtaceae*-lor (CAMPOS și

colab., 2002). Identificarea s-a realizat prin compararea spectrelor de absorbție UV cu cele ale spectrelor compușilor de referință conform CAMPOS și MARKHAM, 2007.

Tabelul 20 (Table 20) **Compușii fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P11**  
*Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P11*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignation based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	35.84	Herbacetina-3-O- glicozid	0,91
2	38.14	Kamferol-3-O- glicozid	1,53
3	43.89	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,77
4	45.13	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,79
5	47.72	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,84
6	49.31	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,36
7	50.57	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,42
8	52.48	Derivat al acidului hidroxicinamic	3,55

Proba P11 a fost alcătuită dintr-un amestec de polen provenit de la *Salicaceae* – *Salix sp.*, *Brassicaceae* – *Brassica sp.*, *Fabaceae* – *Trifolium sp.*, *Rosaceae* – *Prunus sp.*, *Tiliaceae* – *Tilia sp.*, *Asteraceae* – *Centaurea cyanus*, *Centaurea montana*, *Boraginaceae* – *Phacelia tanacetifolia* ș. a. (conform tabelului 5). Picul majoritar în cazul acestei probe a fost reprezentat tot de un derivat al acidului cinamic și s-a înregistrat la minutul 52.48. Flavonoidele identificate în această probă au fost herbacetina și kaempherolul, ambele sub formă glicozidică. Kaempherolul-3-O-glicozid a avut o concentrație superioară herbacetinei-3-O-glicozid. Compușii au fost identificați pe baza comparației cu spectrele de referință existente în profilotecă conform CAMPOS și MARKHAM, 2007.

Tabelul 21 (Table 21) **Compușii fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P12**  
*Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P12*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignation based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	36.08	Herbacetina-3-O- glicozid	1,28
2	37.99	Kamferol-3-O- glicozid	1,35
3	43,72	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,59
4	44.96	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,27
5	47.14	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,51
6	47.98	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,89
7	50.66	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,68
8	52.33	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,61
9	53.46	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,19
10	54.54	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,32
11	55.42	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,31
12	56.37	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,71

Proba P12 a avut în componență un amestec de *Salicaceae* – *Salix sp.*, *Fabaceae* – *Lotus corniculatus*, *Asteraceae* – *Centaurea sp.*, *Fabaceae* – *Trifolium pratense*, *Brassicaceae* – *Brassica sp.*, *Lamiaceae* ș.a (Conform tabelului 5) În această probă au fost

identificate doua flavonoide sub formă glicozidată și zece polifenoli, derivați ai acidului cinnamic. Picul majoritar de la minutul 52.33 aparține clasei polifenolilor și este un derivat al acidului caffeic. Aceasta atribuire s-a realizat pe baza comparației spectrului de absorbție cu spectrele de referință. De asemenea în cazul acestei probe flavonoidele identificate, herbacetină-3-*O*-glicozidată și kaempferol-3-*O*-glicozidat au avut concentrații ridicate. Pe baza spectrelor și a similitudinii acestora cu spectrele de referință s-a apreciat tipul compusului conform CAMPOS și MARKHAM, 2007.

Tabelul 22(Table 22) **Compuși fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P13**  
*Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P13*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignment based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	37.12	Herbacetină-3- <i>O</i> - glicozid	2,51
2	38.96	Kamferol-3- <i>O</i> - glicozid	0,31
3	41.00	Herbacetină-3- <i>O</i> - glicozid	1,49
4	44.64	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,81
5	45.83	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,97
6	46.75	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,48
7	47.97	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,35
8	48.82	Derivat al acidului hidroxicinamic	2,03
9	50.54	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,61
10	51.63	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,70
11	53.22	Derivat al acidului hidroxicinamic	3,72

Amestecul de polen din care a fost alcătuită proba P13 a fost reprezentat de: *Salicaceae* – *Salix sp.*, *Rosaceae* – *Prunus sp.*, *Fagaceae* – *Quercus sp.*, ș.a. (conform tabelului 5). În proba de păstură s-au identificat trei flavonoide sub forma glicozidică, herbacetina și kaempferolul. În cazul acestei probe, spre deosebire de celelalte, picul majoritar (minutul 37.12) a fost reprezentat herbacetină -3-*O*-glicosidică. Identificarea s-a realizat pe baza comparației spectrelor de absorbție UV cu spectrele compuşilor de referință conform CAMPOS și MARKHAM, 2007.

Tabelul 23(Table 23) **Compuși fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P14**  
*Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P14*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignment based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	36.28	Quercetină-3,6- <i>O</i> - glicozid	0,85
2	37.17	Quercetină-3- <i>O</i> - glicozid	0,64
3	38.00	Herbacetină-3- <i>O</i> - glicozid	0,67
4	38.86	Herbacetină-3- <i>O</i> - glicozid	0,68
5	45.03	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,75
6	46.25	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,52
7	48.38	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,80
8	49.15	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,98
9	50.51	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,42

10	51.63	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,93
11	53.16	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,12
12	55.05	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,08
13	55.77	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,12

Proba P14 a fost alcătuită dintr-un amestec de polen de *Boraginaceae* - *Echium vulgare*, *Fabaceae* – *Trifolium sp.*, *Brassicaceae* – *Brassica sp.*, *Plantaginaceae* – *Plantago sp.*, *Fabaceae* - *Lotus corniculatus*, *Vicia sp.* ș.a. (vezi tabel 5). În cazul acestei probe s-au identificat patru flavonoide, doi derivați glicozidici ai quercetinei și doi derivați glicozidici ai herbacetinei. Restul compușilor prezenți au fost derivați ai acidului cinamic. Spre deosebire de alte probe analizate, în cazul acesteia cantitățile de flavonoide și polifenoli au fost destul de reduse. Identificarea compușilor s-a realizat pe baza similitudinii cu compușii de referință conform CAMPOS și MARKHAM, 2007.

Tabelul 24 (Table 24) **Compușii fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P15**  
*Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P15*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignment based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	35.42	Herbacetina-3-O- glicozid	0,33
2	36.55	Quercetina-3-O- glicozid	0,87
3	38.29	Quercetina-3-O- glicozid	0,40
4	41.01	Isoramnethina-3-O- glicozid	0,11
5	43.71	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,23
6	45.01	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,64
7	47.21	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,06
8	49.46	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,02
9	50.79	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,03
10	52.36	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,37
11	53.48	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,71
12	54.49	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,94
13	55.46	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,13
14	56.41	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,74

Plante din familia *Asteraceae* – *Centaurea sp.*, *Fabaceae* – *Lotus corniculatus*, *Asteraceae* - *Achillea millefolium*, *Helianthus annuus*, *Salicaceae* – *Salix sp.*, *Plantaginaceae* – *Plantago sp.*, ș.a. (vezi tabel 5) au alcătuit proba de păstură P14. Derivații de quercetina sunt cei predominanți în această probă. De asemenea a fost identificată și isoramnethina-3-O-glicozid în concentrații mici. Picul maxim este reprezentat de un derivat al acidului cinamic și s-a înregistrat la minutul 56.41. Identificarea compușilor s-a realizat pe baza similitudinii cu compușii de referință conform CAMPOS și MARKHAM, 2007.

Tabelul 25 (Table 25) **Compușii fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P16**  
*Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P16*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignment based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	37.16	Quercetină-3,6- <i>O</i> - glicozid	0,59
2	38.72	Kamferol-3- <i>O</i> - glicozid	0,62
3	39.31	Kamferol-3- <i>O</i> - glicozid	0,49
4	41.30	Herbacetină-3- <i>O</i> - glicozid	0,13
5	42.46	Derivat al acidului hidroxicinamic	Urme
6	44.00	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,05
7	44.87	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,77
8	46.01	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,82
9	49.01	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,77
10	50.53	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,18
11	51.68	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,57
12	53.24	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,39
13	55.20	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,06
14	56.06	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,08

În proba P16 alcătuită dintr-un amestec de *Brassicaceae* – *Brassica* sp., *Salicaceae*- *Salix* sp., *Asteraceae*- *Centaurea cianus*, *Fabaceae* - *Trifolium* sp., *Rosaceae* - *Prunus* sp., *Apiaceae* ș.a (Vezi tabelul 5) au fost identificate patru flavonoide sub formă glicozidică, quercetina, 2 derivați ai kaempferolului și herbacetina. Dintre acestea kaempferolul-3-*O*-glicozid a avut cea mai mare concentrație (0.62 mg/g). Compusul majoritar identificat în această probă a fost un derivat al acidului cinamic, minutul 49.01 și a avut o concentrație de 1.77 (mg/g). Identificarea compușilor s-a realizat pe baza similitudinii cu compuși de referință conform CAMPOS și MARKHAM, 2007.

Tabelul 26 (Table 26) **Compușii fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P17**  
*Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P17*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignment based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	36.92	Herbacetină-3- <i>O</i> - glicozid	1,08
2	38.49	Kamferol-3- <i>O</i> - glicozid	1,16
3	39.07	Kamferol-3- <i>O</i> - glicozid	0,63
4	42.16	Herbacetină-3- <i>O</i> -glicozid	0,25
5	44.62	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,13
6	45.71	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,58
7	46.58	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,93
8	48.13	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,93
9	48.94	Derivat al acidului hidroxicinamic	2,70
10	50.44	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,67
11	51.65	Derivat al acidului hidroxicinamic	2,31
12	53.24	Derivat al acidului hidroxicinamic	5,65
13	55.18	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,31

În proba P17 alcătuită dintr-un amestec de *Brassicaceae* – *Brassica sp.*, *Apiaceae*, *Asteraceae* - *Centaurea cianus*, *Fabaceae* - *Vicia sp* *Trifolium sp.*, *Salicaceae* – *Salix sp.*, ș.a (Vezi tabelul 5) au fost identificate patru flavonoide sub formă glicozidică, 2 derivați ai herbacetinei și 2 derivați ai kamferolul. Dintre aceștia derivații kamferolul-3-*O*-glicozid au avut cea mai mare concentrație (1.16 mg/g). Compusul majoritar identificat în această probă a fost un derivate al acidului cinamic, minutul 53.24 și a avt o concentrație de 5.65 (mg/g). Identificarea compușilor s-a realizat pe baza similitudinii cu compuși de referință conform CAMPOS și MARKHAM, 2007.

Tabelul 27(Table 27) **Compușii fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P18**  
*Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P18*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignation based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	36.55	Herbacetină-3- <i>O</i> - glicozid	0,27
2	37.40	Kamferol-3- <i>O</i> - glicozid	0,28
3	38.46	Quercetină-3,6- <i>O</i> - glicozid	0,37
4	40.03	Quercetină-3- <i>O</i> - glicozid	0,14
5	43.67	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,36
6	45.03	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,79
7	47.24	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,11
8	48.13	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,34
9	49.51	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,28
10	50.80	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,20
11	52.43	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,03
12	53.50	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,40
13	54.60	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,55
14	55.48	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,64
15	56.43	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,01

Proba P18 a fost alcătuită dintr-un amestec de polen de: *Fabaceae* – *Trifolium sp.*, *Salicaceae* – *Salix sp.*, *Asteraceae* - *Centaureas sp.*, *Matricaria sp.*, *Achilea millefolium*, *Graminaceae*, *Lamiaceae*, *Caprifoliaceae* ș.a (Vezi tabelul 5). În acastă probă au fost identificate 4 flavonoide sub formă glicozidică, un derivate al herbacetinei, un derivat al kaempherolului și doi derivați ai quercetinei. În ceea ce privește concentrațiile compusilor din această probă aceștia au concentrații relative mici comparative cu celalalte probe. Picul majoritar este reprezentat de un derivate al acidului cinamic (minutul 52.43). Identificarea compușilor s-a realizat pe baza similitudinii cu compuși de referință conform CAMPOS și MARKHAM, 2007.

Tabelul 28(Table 28) **Compușii fenolici identificați în cromatograma HPLC/DAD a probei P19**  
*Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of sample P19*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignation based on UV spectrum)	Cantitate mg/g Quantity mg/g
1	35.94	Herbacetină-3- <i>O</i> -glicozid	0,27
2	37.24	Kamferol-3- <i>O</i> - glicozid	0,45
3	38.38	Kamferol-3- <i>O</i> - glicozid	0,46



#### Evaluarea potențialului bioactiv al păsturii

4	44.46	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,56
5	45.21	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,25
6	46.87	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,82
7	47.46	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,89
8	49.11	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,64
9	50.19	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,72
10	51.93	Derivat al acidului hidroxicinamic	1,75
11	52.95	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,16
12	54.59	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,80
13	55.92	Derivat al acidului hidroxicinamic	0,22

Proba P19 a avut în componență, conform analizei palinologice, polen de *Boraginaceae- Echium vulgare*, *Fabaceae - Vicia sp.*, *Onobrychis viicifolia*, *Trifolium pratense*, *Asteraceae - Centaurea cyanus*, *Tiliaceae – Tillia sp. ș.a* (Vezi tabelul 5). În cazul acestei probe dintre flavonoide a predominat kaempherolul-3-*O*-glicozid, dar concentrațiile înregistrate au fost relative mici. Picul majoritar și în acest caz a fost reprezentat de un derivate al acidului cinamic și s-a înregistrat la minutul 51.93. Această probă a avut în general concentrații mult mai mici ale compușilor fenolici comparative cu celelalte probe analizate.

Flavonoidele sunt, în general, recunoscute ca fiind marker chemotaxonomici ai plantelor (EREL, 2004) Dovezile obținute în urma acestui studiu și a altor studii efectuate pe polen sugerează faptul că această afirmație este valabilă și pentru polen (CAMPOS și colab., 2002) și implicit păstură.

Aproape toate flavonoidele identificate în cadrul acestui studiu au fost sub formă de derivate glicozidice. În cazul tuturor probelor analizate s-a constatat o predominanță a acizilor fenolici derivați ai acidului cinamic comparativ cu flavonoidele care au fost în număr mai mic. În general toate speciile au unul sau doi compuși flavonoidici predominanți sub formă heterozidică. Când flavonoidele au existat sub formă de aglicone, acestea niciodată nu au coincis cu agliconele formelor glicozidice.

În cazul probelor analizate majoritatea cromatogramelor au fost complexe, dat fiind faptul că păstura este un amestec de polen. Din acest motiv identificarea taxonomică a polenului care a alcătuit probele a fost mult mai dificilă. Există probe care au dat un profil foarte simplu (probele monoflore sau cele care au avut un procent foarte ridicat de polen dintr-o anumită specie > 90%), dar majoritatea probelor au fost alcătuite din mai multe specii de polen, un conținut în compuși polifenolici ridicat și care prin urmare au dat un profil cromatografic extrem de complex.

În acest studiu, profilul cromatografic al compușilor fenolici a coincis în cazul probelor de păstură monofloră (probele de *Brassica sp.* - P5, P8 și de *Eucalyptus sp.*, P9) și a fost independent de originea geografică. Datele obținute în acest studiu au fost asemănătoare cu cele obținute de alți autori (CAMPOS și colab., 1997; CAMPOS și colab., 2002).

## 4.4 Rezultate și discuții privind activitatea antioxidantă

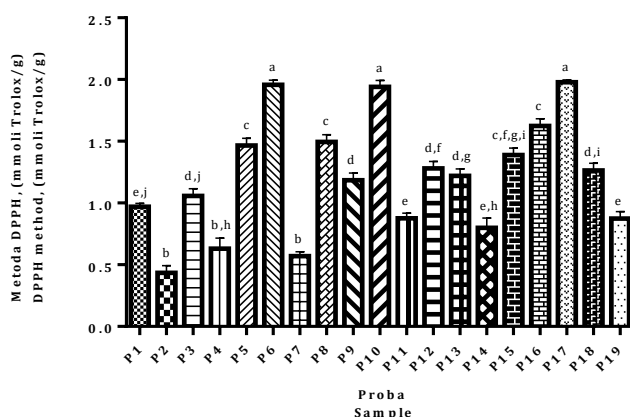
### 4.4 Results and discussions regarding antioxidant activity

Principală abordare, *in vitro*, pentru evaluarea activității antioxidante a unei probe este determinarea capacității sale de a neutraliza sau de a capta radicalii liberi, deoarece activitățile anti-radicale sunt foarte importante în prevenirea deteriorării alimentelor și a sistemelor biologice (NAGAI și colab., 2005; ZULUAGA și colab., 2015). În cadrul acestei lucrări, activitatea antioxidantă a probelor de păstură a fost testată prin trei metode complementare: DPPH, TEAC și FRAP, după cum s-a prezentat și în capitoul Material și metode. Abordarea complementară a acestei analize s-a realizat în ideea comparării și corelării rezultatelor obținute.

#### 4.4.1 Metoda DPPH

##### 4.4.1 DPPH method

Testarea capacității de captare a radicalului liber DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) s-a realizat cu ajutorul metodei spectrofotometrice descrise în capitoul „Material și metodă”.



**Fig. 30. Variația capacității antioxidante a păsturii evaluată prin metoda DPPH**

Fig. 30. Variation of antioxidant capacity of bee bread evaluated through DPPH method

Pentru cunoscerea capacității antioxidante prin metoda DPPH s-a utilizat ecuația de regresie a curbei de calibrare a Trolox-ului:  $y=11.01x+0.651$ ,  $R^2=0.9995$ .

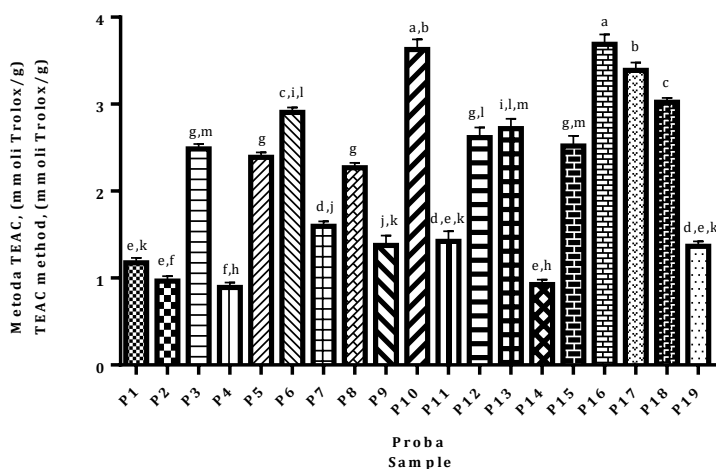
Capacitatea de captare a radicalului liber DPPH a probelor testate a înregistrat valori foarte variate. Cele mai mari valori au fost înregistrate de proba P17 (1.966 mmoli Trolox/g păstură) care a avut în componență specii de polen din familia *Brassicaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae* și *Salicaceae*, urmată de proba P6 (1.935 mmoli Trolox/g păstură) care a conținut un amestec depolenuri din familia *Brassicaceae*, *Salicaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Apiaceae* și proba P10 (1.911 mmoli Trolox/g păstură) care a avut în componență polen de la următoarele familii botanice *Myrtaceae*, *Scrophulariaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*.

Probele P2 cu un amestec de polen din familiile *Fabaceae*, *Asteraceae* și *Lamiaceae* și P7 cu polen din familiile *Fabaceae*, *Tiliaceae*, *Asteraceae*, *Plantaginaceae*, *Rosaceae* s-au dovedit a fi cele mai ineficiente în captarea radicalului liber DPPH și au obținut valori de doar 0.402 (mmoli Trolox/g păstură), respectiv 0.551 (mmoli Trolox/g păstură).

## 4.4.2 Metoda TEAC

### 4.4.2 TEAC method

Testarea capacității de captare a radicalului liber ABTS s-a realizat cu ajutorul metodei spectrofotometrice descrise în capitolul „Material și metodă”. Rezultatele au fost calculate pe baza curbei de calibrare a Troloxului și s-a utilizat ecuația de regresie a curbei de calibrare:  $y=18.71x+1.52$ ,  $R^2=0.9998$ .



**Fig. 31. Variația capacității antioxidante a păsturii evaluată prin metoda TEAC**

Fig. 31. Variation of antioxidant capacity of bee bread evaluated through TEAC method

În cadrul testului de captare al radicalului ABTS, probele de păstură au demonstrat o variabilitate foarte mare a capacității antioxidante. Valorile obținute au fost situate în intervalul 0.891 mmoli Trolox/g (P14 – amestec de polen provenit de la *Boraginaceae*, *Fabaceae*, *Brassicaceae*, *Plantaginaceae*, *Fabaceae*) și 3.691 mmoli Trolox/g (P16 cu amestec de polen provenit de la *Brassicaceae*, *Salicaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Apiaceae*). Valori bune ale capacității antioxidante au avut și probele P10 (*Myrtaceae*, *Scrophulariaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*), P17 (*Brassicaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae* și *Salicaceae*) și P6 (*Brassicaceae*, *Salicaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Apiaceae*).

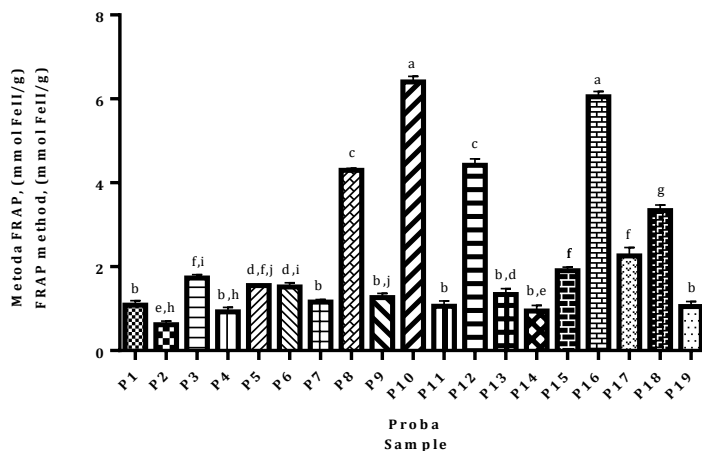
Rezultatele sunt comparabile cu cele obținute de IVANIŠOVÁ și colab., (2015) care a raportat că toate probele de păstură testate au avut efect antioxidant împotriva

radicalului liber ABTS. Cel mai bun efect antioxidant a fost obținut pentru păstura din Poltava, 15.78 mg TEAC/g<sup>-1</sup> și din Vinnica 4.62 mg TEAC/g<sup>1</sup>.

#### 4.4.3 Metoda FRAP

##### 4.4.3 FRAP method

Potențialul antioxidant total (FRAP) s-a determinat utilizând metoda descrisă în capitolul „Material și metodă”. Pentru metoda FRAP, rezultatele au fost calculate pe baza curbei de calibrare trasată cu ajutorul soluțiilor de concentrație cunoscută de FeSO<sub>4</sub>:  $y=0.53271x-0.004$ ,  $R^2=0.9998$ , rezultatele fiind exprimate în mmol Fe<sup>II</sup>/g.



**Fig. 32. Variația capacității antioxidante a păsturii evaluată prin metoda FRAP**

Fig. 32. Variation of antioxidant capacity of bee bread evaluated through FRAP method

Capacitatea de reducere a ionului feric, testată prin metoda FRAP, a înregistrat valori foarte diferite pentru probele de păstură analizate. Comparativ cu celelalte două metode testate, diferențele dintre valorile obținute prin metoda FRAP au fost semnificative ( $p<0,05$ ). Astfel, cea mai mică valoare a fost înregistrată de proba P2 (*Fabaceae*, *Asteraceae* și *Lamiaceae*) de 0.563 mmol Fe<sup>II</sup>/g, iar cea mai mare valoare a fost înregistrată de proba P10 (*Myrtaceae*, *Scrophulariaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*) de 6.321 mmol Fe<sup>II</sup>/g. O capacitate bună de captare a ionului feric au prezentat și probele P16 (*Brassicaceae*, *Lamiaceae*, *Salicaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Apiaceae*), P12 (*Salicaceae*, *Fabaceae*, *Asteraceae*) și P8 (*Brassicaceae*).

Activitatea antioxidantă redusă a unor probe poate fi explicată de conținutul redus de polifenoli și flavonoide prezente în aceste probe. Diferențele observate între activitățile antioxidante ale probelor testate pot fi atribuite prezenței antioxidantilor naturali, în principal compusilor fenolici care diferă în funcție de regiunea din care a fost colectat polenul și de originea sa botanică, observație susținută și de IVANIŠOVÁ și colab., 2015; TLILI și colab., 2014. Rezultatele acestui studiu realizat pe diferite extracte

de păstură din România și India au demonstrat o bună corelație între conținutul total de polifenoli și capacitatea lor antioxidantă.

Capacitatea extractelor de păstură de a bloca a radicalii liberi a fost testată de și de BALTRUŠAITYTE și colab., (2007). În acest studiu s-a raportat că după procesare termică, păstura a avut o acțiune inhibantă a radicalul ABTS<sup>•+</sup> comparabilă cu probele de miere și cu probele de păstură amestecată cu miere. Și o acțiune inhibantă mai mare a radicalului liber DPPH• (94% PI) decât probele de miere și păstură amestecată cu miere.

ZULUAGA și colab., (2015) a folosit două metode de evaluare a activității antioxidante a păsturii: TEAC (bazată pe inhibarea radicalului ABTS<sup>•+</sup>) și FRAP (bazată pe reacția radicalului feric). Pentru metoda FRAP valorile au variat între 35.0 și 70.1  $\mu\text{mol Trolox/g}$  păstură și pentru metoda TEAC între 46.1 și 76.2  $\mu\text{mol Trolox/g}$  păstură. Testele au fost realizate comparativ cu polenul de albine, în cazul căruia au fost raportate valori care au variat între 67.0  $\mu\text{mol Trolox/g}$  (FRAP) și 76.2  $\mu\text{mol Trolox/g}$  (TEAC), se poate observa reducerea valorilor în cazul păsturii, coroborând la scăderea activității antioxidante, așa cum s-a constatat și în cazul flavonoidelor.

Activitatea antioxidantă a păsturii este dată de compușii fenolici care au proprietăți redox și care joacă un rol important în captarea radicalilor liberi, inclusiv a radicalilor de oxigen sau peroxid (NIJVELDT și colab., 2001). Aceste proprietăți sunt strâns legate de structura chimică a compușilor, în special de numărul de grupări hidroxil legate de nucleul aromatic și de legăturile duble conjugate. În completarea efectului individual, moleculele antioxidante interacționează sinergetic (ZULUAGA și colab., 2014) și astfel se pot proteja reciproc de stresul oxidativ (EREL, 2004). Polifenolii reprezintă aceea parte a compoziției chimice care variază în funcție de planta de la care este colectat polenul și de perioada anului, fiind o matrice extrem de complexă și neomogenă.

În general rezultatele obținute sunt comparabile cu studiile existente în literatură de specialitate despre păstura românească care sunt extrem de puține. Un astfel de studiu a realizat (COCAN și colab., 2009) care a determinat activitatea antioxidantă a extractelor de polen și păstură prin cele trei metoda utilizate și în această lucrare, DPPH, FRAP și TEAC. Aceasta a raportat că activitatea antioxidantă a păsturii a variat în funcție de solventul utilizat la extracție, cele mai bune rezultate în cazul metodei DPPH, fiind obținute pentru extractele metanolice și metanol:apă, 93.35% PI respectiv, 70.80% PI. Cât despre valoarea FRAP cea mai ridicată a fost de 0.404  $\text{mmol Fe}^{II}/\text{g}^{-1}$  pentru extractul metanolic și cea mai scăzută de: 0,196  $\text{mmol Fe}^{II}/\text{g}^{-1}$  pentru extractul apos, iar valoarea TEAC cea mai ridicată s-a înregistrat tot în extractul metanolic și a fost de 0.43 ( $\text{mmol Trolox/g}^{-1}$ ), iar cea mai scăzută 0.14 ( $\text{mmol Trolox/g}^{-1}$ ) în extractul cu apă.

Astfel activitățile antioxidante ale diferitelor extracte de păstură au fost asociate în mod clar cu conținutul lor de substanțe antioxidante (polifenoli) și s-a observat că extractele în apă care conțin cantitatea cea mai mică de polifenoli totali, flavonoli și flavone prezintă potențialul antioxidant cel mai scăzut atât în ceea ce privește activitatea

de captare a radicalului DPPH (55,69%), cât valoarea FRAP și TEAC (COCAN, și colab., 2009).

MĂRGHITAȘ și colab., (2009) indică, de asemenea, că există o mare variabilitate în ceea ce privește corespondența dintre activitatea antioxidantă și conținutul total de polifenoli din polenul cu origini botanice diferite, ceea ce a fost relatat anterior și de CAMPOS și colab. (2003) care a dat o informație utilă, care contribuie la identificarea taxonomică a polenului analizat.

Păstura s-a dovedit a fi o sursă bogată de compuși fenolici, care sunt în general asociați cu o activitate antioxidantă ridicată. Consumul acestora poate duce la reducerea riscului bolilor degenerative, reducerea stresului oxidativ și inhibarea oxidării macromoleculelor (CAROCHO ȘI FERREIRA 2013). În ceea ce privește proprietățile funcționale, cum ar fi activitatea antioxidantă a acestui produs, este predictibil faptul că acest produs apicol se va utiliza din ce în ce mai mult ca și aliment sănătos și ca și supliment alimentar.

În ciuda activității antioxidante evidente a păsturii nu există suficiente informații sistematice despre activitatea antioxidantă și profilul compușilor bioactivi din păstură.

## 4.5 Rezultate și discuții privind activitatea antimicrobiană

### 4.5 Results and discussions on antimicrobial activity

Activitatea antibacteriană a extractelor de păstură a fost determinată utilizând descrisă în capitolul „Material și metodă”.

Metoda spectrofotometrică a fost utilizată pentru a testa activitatea antimicrobiană asupra 6 tulpini bacteriene gram pozitive: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus laterosporus*, *Paenibacillus larvae*, *Paenibacillus alvei*, *Enterococcus faecalis* și 3 tulpini de bacterii gram negative: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Salmonella enteritidis*.

Apa a fost utilizată ca și solvent pentru a nu influența activitatea antimicrobiană a probelor.

În general, toate probele testate au avut activitate antibacteriană asupra tulpinilor testate, dar cel mai bun efect antimicrobian a fost înregistrat împotriva bacteriilor gram pozitive. Dintre acestea tulpinile de *Staphylococcus aureus* și *Paenibacillus alvei* au fost cele mai sensibile la acțiunea extractelor de păstură.

O foarte bună activitate antimicrobiană a fost prezentă în cazul probeelor P6 (*Brassicaceae*, *Salicaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Apiaceae*) și P11 (*Salicaceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Tiliaceae*, *Asteraceae*, *Rosaceae*) împotriva bacteriilor gram pozitive.

În ceea ce privește bacteriile gram negative testate, *Pseudomonas aeruginosa*, a prezentat cea mai mare sensibilitate la acțiunea extractelor de păstură și s-au remarcat prin efectul puternic antimicrobian probele P2 (*Fabaceae*, *Asteraceae* și *Lamiaceae*), P11

(*Salicaceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Tiliaceae*, *Asteraceae*, *Rosaceae*) și P16 (*Brassicaceae*, *Salicaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Apiaceae*).

Rezultatele efectului antimicrobian al probelor de păstură asupra fiecărei tulpini bacteriene este prezentat în figurile 31-33.

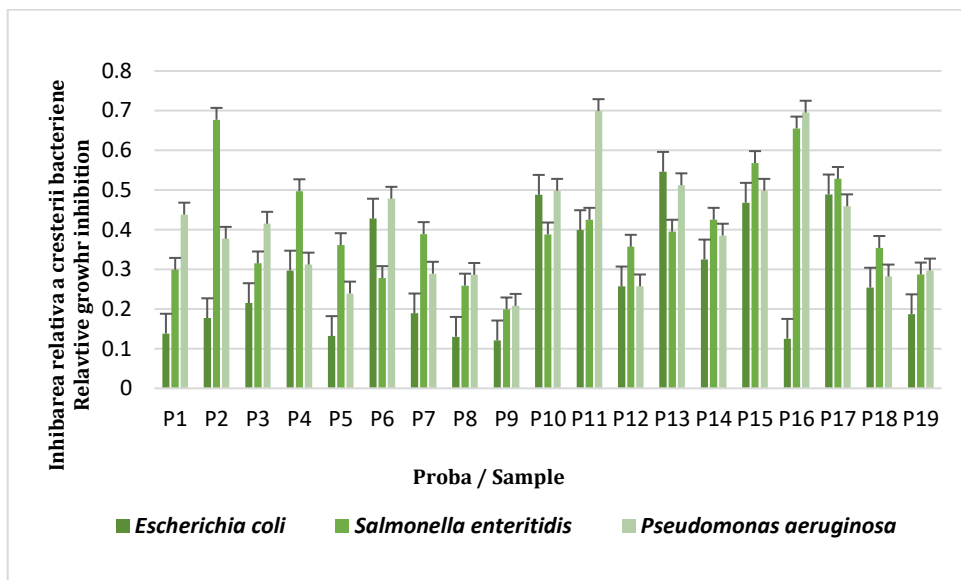


Fig. 33. Inhibarea relativă a creșterii bacteriene în dependență de extractul de păstură

Fig. 31. Relative growth inhibition in dependence of bee bread extract

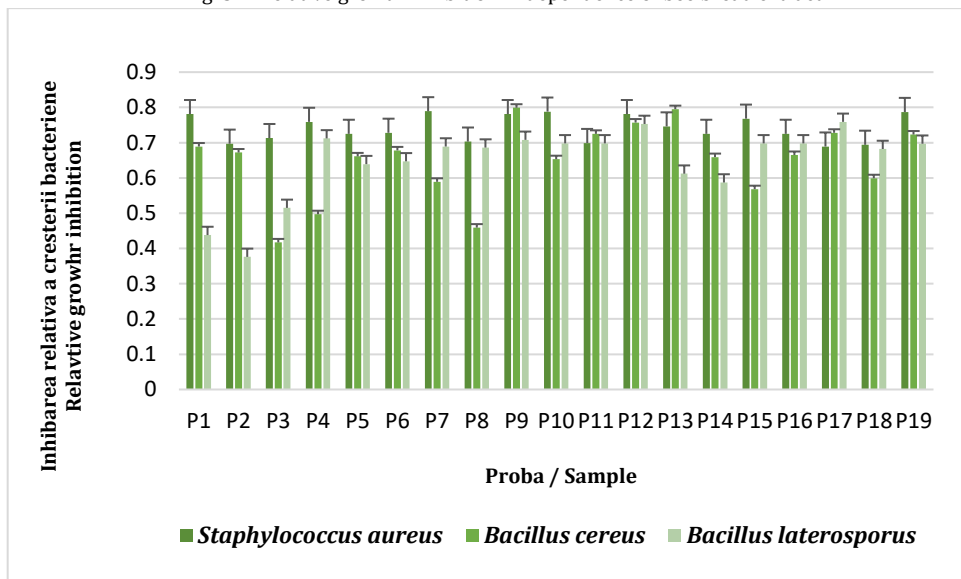


Fig. 34. Inhibarea relativă a creșterii bacteriene în dependență de extractul de păstură

Fig. 32. Relative growth inhibition in dependence of bee bread extract

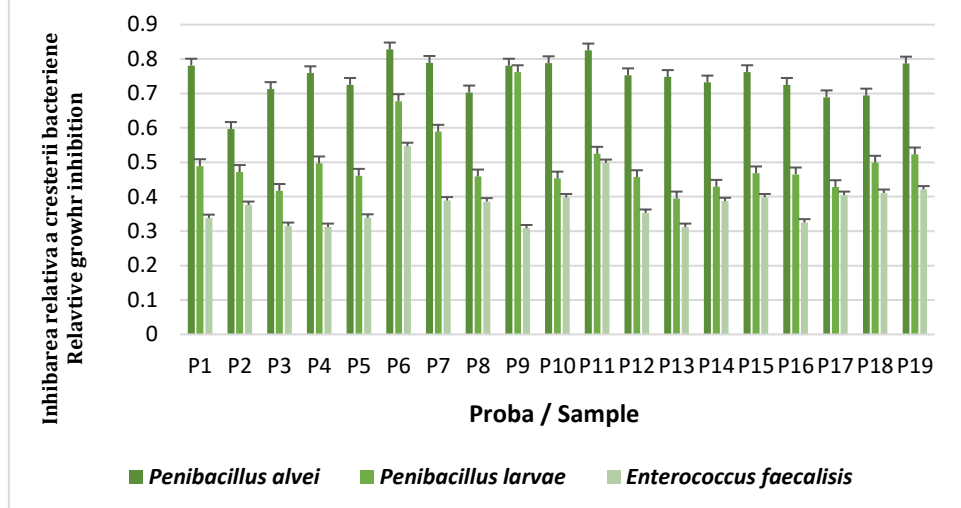


Fig. 35. Inhibarea relativă a creșterii bacteriene în dependență de extractul de păstură

Fig. 33. Relative growth inhibition in dependence of bee bread extract

Rezultatele obținute sunt în concordanță cu cele din literatură de specialitate.

ABOUDA și colab, (2011) a testat păstura marocană care avea în componență polen de la diferite plante aromatice și medicinale împotriva a 14 tulpini bacteriene multirezistente, isolate din diverse patologii umane. Acesta a testat efectul antibacterian pe trei tulpini de *E. coli*, o tulpină de *Salmonella enteritis* trei tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, trei tulpini de *Staphylococcus aureus*, trei tulpini de *Streptococcus* și o tulpină de *Bacillus cereus* prin metoda difuzimetrică. Rezultatele testelor au relevat că toate tulpinilor bacteriene au fost inhibitate de diluția  $\frac{1}{2}$  și majoritatea au fost inhibitate și de diluția  $\frac{1}{4}$ . Bacteriile gram pozitive au fost mai sensibile, decât cele gram negative. Toate probele au prezentat acțiune antimicrobiană împotriva *Pseudomonas aeruginosa* multirezistentă.

IVANIŠOVÁ și colab., (2015) a evaluat acțiunea antimicrobiană a păsturii ucrainiene prin metoda difuzimetrică și concentrația minimă inhibitoare prin metode spectrofotometrice pe: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica subs. enterica*, *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus aureus subs. aureus*. Rezultatele au arătat că toate probele au avut efect inhibant asupra acestor tulpini într-o oarecare măsură, dar cele mai bune efecte antimicrobiene au fost înregistrate împotriva tulpinilor gram negative.

Efectul antimicrobian al păsturii este atribuit în special substanțelor polifenolice, dar și acizilor grași, aminoacizi etc. Compușii fenolici pot afecta creșterea și metabolismul bacteriilor, dar ei pot avea fie un efect inhibitor, fie un efect stimulator, în funcție de concentrația și de tipul de compus fenolic (ESTEVINHO și colab., 2008; MORAIS și colab., 2011). Mecanismul prin care compușii fenolici inhibă creșterea bacterienă constă în formarea de complexe cu polipeptidele aflate la suprafața peretelui



celulei bacteriene prin adeziune și/sau de enzimele membranei celulare ceea ce duce la distrugerea integrității peretelui, blocarea canalelor ionice și inhibarea fluxului de electroni în lanțul de transport al electronilor care determină sinteza adenozin trifosfatului (ATP) (CUSHNIE și LAMB, 2005).

În studiul lui (ABOUDA și colab., 2011) atât probele de polen cât și cele de păstură au avut efect inhibant, singura diferență fiind în procentul de inhibiție al fiecărei tulpini. Aceste modele de sensibilitate diferite ale tulpinilor sunt datorate compușilor fenolici diferiți din constituția fiecărei probe (ALMEIDA-MURADIAN și colab., 2005). Fiecare tip de polen are specificul său, iar compoziția sa chimică diferă în funcție de originea botanică (NAGAI și colab., 2004).

BALTRUSAITYTE și colab., (2007) a testat efectul antibacterian a 34 de probe de miere și 4 probe de păstură, precum și amestecuri de miere cu păstură în diferite proporții (50, 25 și 10 %) împotriva *Staphylococcus aureus* și *Staphylococcus epidermidis*, utilizând metoda difuzimetrică. Toate cele patru probe de păstură testate au avut activitate antibacteriană împotriva bacteriilor testate.

Studiile efectuate de (ABOUDA și colab., 2011; BALTRUSAITYTE și colab., 2007; IVANIŠOVÁ și colab., 2015, URCAN și colab., 2018) privind activitatea antibacteriană și concentrația minimă inhibitorie a diferitelor tipuri de păstură (Maroc, Lituania, Ucraina, România) în solvenți diferiți (metanol, DMSO etanol, apă) au dus la diferențe între concentrația minimă inhibitorie de la un studiu la altul. De aici rezultă că un rol important în potențialul antimicrobian al unui extract îl are atât originea botanică a probei cât și solvantul utilizat pentru extracții. Din păcate în studiile citate nu este menționată originea botanică a probelor de păstură analizate.

URCAN și colab., (2018) a testat efectul antimicrobian al păsturei românești, prin metoda spectrofotometrică. Rezultatele au arătat că toate probele testate au avut activitate antimicrobiană într-o oarecare măsură, dependent de concentrația testată. Bacteriile Gram pozitive au fost mai sensibile decât cele Gram negative, iar împotriva tulpinii de *Staphylococcus aureus* s-au obținut cele mai bune rezultate.

Rezultatele acestui studiu demonstrează că păstura este o foarte bună sursă de compuși bioactivi care au nu numai efect antioxidant, ci și efect antimicrobian. Rezultatele obținute sunt susținute și de alte studii pe polenul de albine (DE-MELO și colab., 2018; JIN și colab., 2017; PASCOAL și colab., 2014).

## 5. Rezultate și discuții privind polenul fermentat artificial

### 5. Results and discussions on artificially fermented pollen

Pentru obținerea păsturei în mod natural albinele prezează polenul colectat în celulele fagurilor și mai adaugă salivă, nectar și miere (BOGDANOV, 2016). Amestecul de polen sub influența temperaturii, a enzimelor și a microbiotei naturale din polen se transformă în păstură. În cadrul acestui experiment s-a încercat reproducerea acestui proces în condiții de laborator și evaluarea calității produsului obținut.

Studiile existente în literatură cu privire la calitatea polenului fermentat artificial sunt extrem de puține, majoritatea studiilor existente prezentând o rețetă optimă pentru producerea păsturii în mod artificial și comparând produsul fermentat obținut cu păstura naturală doar în ceea ce privește nutrienții acesteia (proteine, glucide, lipide).

Studii comparative polen – polen fermentat – păstură, privind compuși nutritivi (proteine, glucide, lipide) nu sunt suficiente, întorcând păstura, la fel ca și polenul este un produs extrem de complex, care posedă compuși biologic activi cu potențial antioxidant, antimicrobian și antitumoral dovedit (ABOUDA și colab., 2011; BALTRUŠAITYTE și colab., 2007; SOBRAL și colab., 2017). Astfel este foarte important ca rețeta să fie optimizată astfel încât să nu se piardă acești compuși valoroși pentru organismul uman.

În acest studiu s-a dorit compararea polenului materie primă cu polenul fermentat și cu păstura naturală în ceea ce privește conținutul de aminoacizi, acizi grași, compuși polifenolici și activități antioxidante și antimicrobiene.

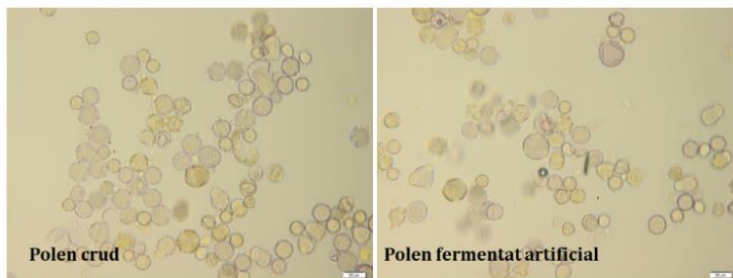
Studiile existente în literatură (KAŠKONIENĖ și colab., 2018; ARANEDA și colab., 2014; VÁSQUEZ și OLOFSSON, 2009) care prezintă "rețete" de producere a păsturii artificiale, utilizează fiecare dintre ele o altă metodă, iar evaluarea rezultatelor în cadrul acestor studii se realizează în mod diferit, prin urmare și rezultatele acestora sunt foarte diferite, ceea ce face comparația rezultatelor obținute în cadrul acestei lucrări cu literatura de specialitate extrem de dificilă.

Pentru realizarea produsului tip păstură s-a urmat protocolul descris în capitolul Material și metode, iar rezultatele obținute sunt prezentate în cele ce urmează.

## 5.1 Rezultate și discuții privind originea botanică

### 5.1 Results and discussions regarding botanical origin

Microscopic s-a examinat aspectul grăuncioarelor de polen pentru identificarea originii botanice a polenului, dar și pentru examinarea aspectului grăunciorului înainte și după procesul fermentativ pentru a observa eventuale modificări, dar în cazul probelor analizate nu au existat diferențe între aspectul grăunciorului de polen înainte și după procesul fermentativ.



**Fig. 36. Imaginea microscopică a probei BP5 înainte și după fermentație (imagini originale)**

Fig. 36. Microscopic images of sample BP5 before and after fermentation (original images)

Tabelul 29(Table 29) **Familia și specia plantelor de la care provine polenul din probele analizate**

*Family and plant species of the pollen from the analyzed samples*

Proba Sample	Polenul predominant <i>Predominant pollen (&gt;45%)</i>	Polenul secundar <i>Secondary pollen (16- 45%)</i>	Polenul important minor <i>Important minor pollen (3-15%)</i>	Polenul minor <i>Minor pollen (&lt;3%)</i>
	<i>Familia-Specia Family-Species</i>	<i>Familia-Specia Family-Species</i>	<i>Familia-Specia Family-Species</i>	<i>Familia-Specia Family-Species</i>
BP1	<b>Fabaceae-</b> <i>Ulex europaeus</i>	<b>Cistaceae-</b> <i>Cistus sp.</i>	<b>Rutaceae –</b> <i>Citrus sp.</i>	
BP2	<b>Cistaceae-</b> <i>Cistus sp.</i>	<b>Fabaceae-</b> <i>Ulex europaeus</i>	<b>Rutaceae –</b> <i>Citrus sp.</i>	
BP3	<b>Lamiaceae-</b> <i>Salvia officinalis</i>			
BP4		<b>Salicaceae -</b> <i>Salix. Sp.</i> <b>Rosaceae -</b> <i>Prunus sp.,</i>	<b>Asteraceae –</b> <i>Taraxacum sp.</i> <b>Fabaceae-</b> <i>Trifolium sp.</i>	
BP5		<b>Plantaginaceae-</b> <i>Plantago sp.</i> <b>Boraginaceae -</b> <i>Echium vulgare</i>	<b>Brassicaceae-</b> <i>Brassica sp.</i> <b>Asteraceae-</b> <i>Taraxacum sp.</i> <b>Salicaceae-</b> <i>Salix sp.</i> <b>Fabaceae-</b> <i>Trifolium sp.</i> <b>Apiaceae</b> <b>Lamiaceae</b> <b>Gramineae</b> <b>Rosaceae</b>	<b>Tiliaceae-</b> <i>Tilia sp.</i>

## 5.2 Rezultate și discuții privind determinarea valorii nutritive

### 5.2 Results and discussions regarding determination of nutritive value

#### 5.2.1 Conținutul de apă

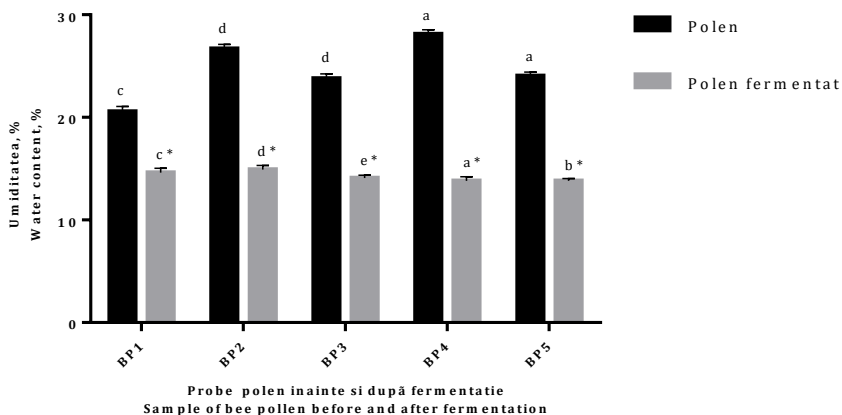
##### 5.2.1 Water content

Conținutul de apă din probele de polen și polen fermentat a fost determinat prin metoda descrisă în capitolul Material și metode, iar rezultatele sunt prezentate în graficul din Fig. 35.

Proba BP4 cu polen de *Salix sp.* și *Prunus sp.* a avut cantitatea de apă cea mai ridicată, iar BP1 (*Ulex europaeus*) cea mai scăzută.

Cantitatea de apă este un parametru extrem de important în ceea ce privește stabilitatea produsului. Cu cât cantitatea de apă este mai mare cu atât produsul este mai predispus la dezvoltarea microorganismelor. Cantitatea de apă a fost mult mai ridicată

în cazul polenului crud care a avut o medie de 24.63%, decât în produsul rezultat în urma procesului fermentativ care a avut o medie de 14.25%.



**Fig. 37. Conținutul de apă din probele de polen înainte și după fermentație**

Fig. 37. Water content of bee pollen samples before and after fermentation

\*=semnificativ diferit pentru  $p < 0.05$ .

Această valoare obținută pentru produsul fermentat este apropiată de media obținută pentru păstura naurală și anume, 11.94% și de datele raportate în literatură pentru aceasta (TOMÁS și colab., 2017; ZULUAGA și colab., 2015).

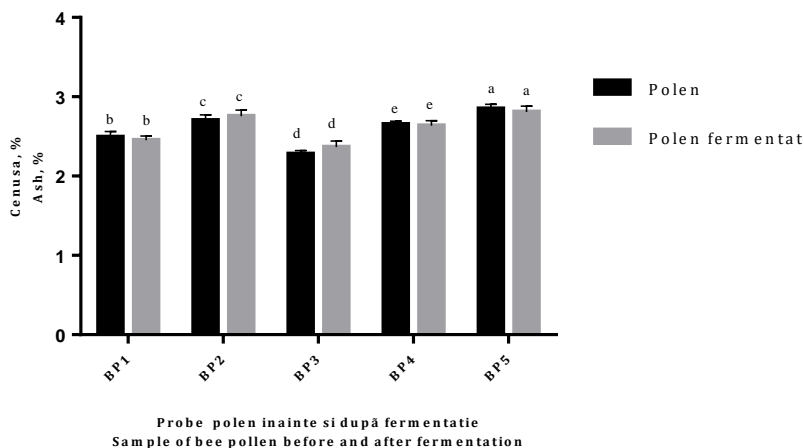
## 5.2.2 Conținutul de cenușă

### 5.2.2 Ash content

Conținutul de cenușă din probele de polen și polen fermentat a fost determinat prin metoda descrisă în capitolul Material și metode, iar rezultatele sunt prezentate în graficul din Fig. 36.

Cantitatea de cenușă reflectă conținutul total de minerale din probele de polen și variază în funcție de originea botanică și geografică a acestuia, dar nu există diferențe semnificative între probele fermentate și cele nefermentate.

În general, valorile obținute în cadrul acestui studiu sunt în concordanță cu valorile prezentate de către ANĐELKOVIĆ și colab., (2012) care a obținut valori de 3.05%, în timp ce media conținutului de cenușă raportat de ZULUAGA și colab., (2015) pentru păstura columbiană a fost de 2.45 % și a variat între 2.19 și 2.60 %.



**Fig. 38. Conținutul de cenușă din probele de polen înainte și după fermentație**

Fig. 38. Ash content of bee pollen samples before and after fermentation

Litere identice înseamnă diferențe nesemnificative pentru  $p < 0.05$ .

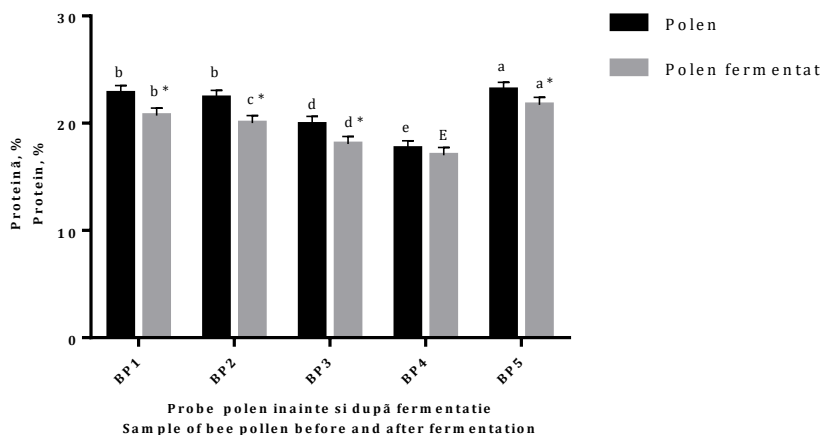
De asemenea rezultatele obținute sunt susținute și de studiile anterioare, ale procentului de cenușă din polenul de albine, care recomandă pentru polenul de albine, o valoare a cenușii care să nu depășească 6% (CAMPOS și colab., 2008; NICOLSON și NICOLSON, 2011).

### 5.2.3 Conținutul de proteine

#### 5.2.3 Proteins content

Proteinele constituie un parametru extrem de important pentru calitatea polenului și a păsturii și pentru valoarea sa energetică. Conținutul de proteine al probeleor de polen și polen fermentat a fost determinat prin metoda descrisă în capitolul Material și metode.

Din graficul din Fig. 37 se observă o variație a valorii proteinelor polenului nefermentat între 17.15 în proba BP4 (*Salix sp.*, *Prunus sp.*) și 23.61% în proba BP5 (*Plantago sp.*, *Echium vulgare*). În ceea ce privește probele de polen fermentat, o variație între 16.52% (BP4) și 22.21% (BP5) a proteinelor a fost observată. Aceste variații între probe poate fi explicată de către originea botanică diferită a probelor. Media conținutului de proteine a scăzut în urma procesului fermentativ de la 21.16% la 19.50%.



**Fig. 39. Conținutul total de proteine din probele de polen înainte și după fermentație**

Fig. 39. Total protein content of bee pollen samples before and after fermentation

\*=semnificativ diferit pentru  $p < 0.05$ .

Litere identice înseamnă diferențe nesemnificative pentru  $p < 0.05$ .

Rezultatele obținute sunt în conformitate cu cele calculate pentru probele de păstură naturală care au avut o medie de 20.39%, dar și cu cele din literatură. TOMÁS și colab., (2017) au obținut pentru păstura portugheză, valori ale proteinei totale cuprinse între 14-22% cu o medie de 18%, în timp ce SALAZAR-GONZÁLEZ și DÍAZ-MORENO, (2016) au raportat o medie a valorii proteinelor egală cu 21.1%.

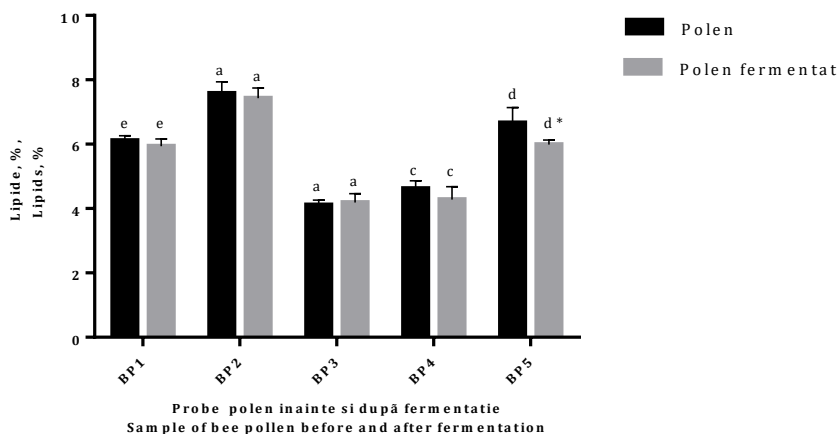
Conținutul de proteine din păstură este una dintre cele mai apreciate caracteristici nutriționale tocmai din acest motiv este important să se mențină acest parametru la nivel ridicat într-un produs obținut artificial din polen.

## 5.2.4 Conținutul de lipide

### 5.2.4 Lipids content

Conținutul de lipide al probeleor de polen și polen fermentat a fost determinat prin metoda descrisă în capitolul Material și metode, iar rezultatele sunt prezentate în graficul din Fig. 38.

Între procentul de lipide din probele de polen și din probele de polen fermentat nu există diferențe semnificative. Valorile obținute pentru polen au avut variat între 4.11 (BP3 – *Salvia officinales*) și 7.83 (BP2 – *Cistus sp.*) cu o medie de 5.81%, în timp ce variația în cazul polenul fermentat a fost între 4.00 și 7.65% cu o medie de de 5.56%. Scăderea ușoară a valorilor lipidelor totale a fost constată în toate probele, cu excepția BP3 – (*Salvia officinales*). Conținutul de lipide al probele de păstură natural analizate a variat între 4.89 și 14.74%.



**Fig. 40. Conținutul total de lipide din probele de polen înainte și după fermentație**

Fig. 40. Total lipids content of bee pollen samples before and after fermentation

\*=semnificativ diferit pentru  $p < 0.05$ .

Litere identice înseamnă diferențe nesemnificative pentru  $p < 0.05$ .

Variația foarte mare a procentului de lipide din probele analizate este data de originea botanică a polenului, de cantitatea de acizi grași, carotenoide și vitamine prezente în polen.

Media conținutului de lipide din probele de păstură analizate de către de TOMÁS și colab., (2017) a fost de 7.85%, cu o valoare minimă de 3.6% și o valoare maximă de 14.9%. Aceste valori sunt comparabile cu rezultatele obținute în cadrul acestui studiu, iar ZULUAGA și colab., (2015) a raportat valori cuprinse între 1.65 și 5.50% cu o media 3.40 %. Literatura de specialitate este mult mai bogată în cazul polenului, iar conținutul de lipide pentru acesta în standardele de calitate este prezentat ca fiind cuprins între 1 și 13%, cu 1,3% ca limită minimă (CAMPOS și colab., 2008).

## 5.2.5 Conținutul de glucide libere

### 5.5.5 Free sugars content

Conținutul de glucide libere al probeleor de polen și polen fermentat a fost determinat prin metoda descrisă în capitolul Material și metode, iar rezultatele sunt prezentate în tabelul 30.

Probele BP1 și BP2 care au avut în componență polen de *Ulex europaeus*, *Cistus sp.* și *Citrus sp.* în diferite proporții au avut cea mai mare cantitate de glucide, urmate de proba BP4 care a avut în componență polen de *Salix sp.*, *Prunus sp.*.

**Tabel 30(Table 30) Conținutul de glucide libere din probele de polen înainte și după fermentație\***

*Free sugars content of bee pollen before and after fermentation\**

Proba Sampl e	Fructoză Fructose (%)		Glucoză Glucose (%)		Turanoză Turanose (%)		Maltoză Maltose (%)	
	Polen	Polen fermentat	Polen	Polen fermentat	Polen	Polen fermentat	Polen	Polen fermentat
<b>BP1</b>	19.10±0.15	16.60±0.21	10.21±0.21	8.50±0.22	0.75±0.21	0.75±0.11	0.49±0.01	0.49±0.12
<b>BP2</b>	17.34±0.25	14.230±0.25	12.14±0.22	9.61±0.18	1.13±0.22	1.13±0.20	0.48±0.09	0.48±0.18
<b>BP3</b>	16.20±0.10	14.42±0.18	8.11±0.30	4.90±0.10	0.90±0.11	0.90±0.15	0.52±0.12	0.52±0.08
<b>BP4</b>	18.81±0.30	16.31±0.13	9.53±0.15	6.82±0.28	0.94±0.12	0.94±0.10	0.52±0.10	0.52±0.02
<b>BP5</b>	20.12±0.12	17.18±0.22	7.10±0.21	5.56±0.24	0.89±0.12	0.89±0.10	0.61±0.10	0.61±0.11

\*Rezultatele reprezintă media a trei determinări independente.

\*Results represent the mean of three independent determinations.

Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu pentru polenul fermentat sunt comparabile cu cele obținute pentru păstură naturală (vezi tabelul 6). Față de conținutul de glucide identificat în polen, în probele fermentate s-a constatat o ușoară scădere a conținutului de glucide, datorată procesului fermentativ, situație raportată și de alți autori (BAI și colab., 2008; JOHN și colab., 2007; ABDEL-RAHMAN și colab., 2011). Acest lucru poate fi explicat prin posibilitatea participării microflorei naturale a polenului la fermentație, deoarece probele nu au fost sterilizate înainte de analiză.

Există puține publicații despre profilul glucidelor din polen și chiar mai puțin despre profilul glucidelor din păstură și nici un studiu comparativ între profilul glucidic al polenului înainte și după fermentație, în consecință datele obținute au fost comparate cu cele raportate anterior pentru păstură și polen.

SZCZESNA (2007) a raportat prezența fructozei în cele mai mari cantități, urmată de glucoză. Monozaharidele exprimate ca fructoză și glucoză au reprezentat aproximativ 83% din fracțiunea zaharurilor identificate în polen. Din dizaharidele analizate zaharoza a reprezentat 8% și maltoza 7%, iar trehaloză și turanoză aproximativ 1% fiecare, aspect valabil și pentru păstură și pentru polenul fermentat.

Aceste zaharuri nu reprezintă totalul de carbohidrați din probele de păstură ci doar glucidele libere, ceea ce înseamnă că există și alte glucide, cel mai probabil legate sub formă glicozidică.

## 5.2.6 Valoarea nutritivă

### 5.2.6 Nutritive value

Carbohidrații totali au fost calculați prin diferență, după determinarea cenușii, a proteinelor și a lipidelor (MERILL și WATT, 1955).

Valoarea energetică a polenului fermentat a avut o medie de 429.12 kcal/100 g. Această valoare este comparabilă cu valoarea obținută pentru păstura naturală, 451.22 kcal/100 g, dar și cu datele raportate de către TOMÁS și colab., (2017). Aceste rezultate confirmă faptul că polenul și păstura sunt o bogată sursă de nutrienți.



Tabalul 31 (Table 31)

***Valoarea nutritivă a probelor de polen\****  
*Nutritional value of bee pollen samples\**

Proba Sample	Conținutul de apă Water content (%)	Conținutul de cenușă Ash content (%)	Conținutul de proteine Protein content (%)	Conținutul de lipide Lipid content (%)	Carbohidrați totali Total carbohydrates (%)	Valoare energetică Energy value kcal/100 g
<b>BP1</b>	20.21±0.51	2.44±0.12	22.80±0.18	6.11±0.21	68.65	431.77
<b>BP2</b>	26.39± 0.40	2.65±0.25	22.36±0.17	7.58±0.18	67.41	438.55
<b>BP3</b>	23.47±0.31	2.25±0.11	19.88±0.21	4.11±0.24	73.76	422.15
<b>BP4</b>	27.81±0.11	2.62±0.14	17.65±0.24	4.62±0.16	75.11	423.28
<b>BP5</b>	23.77± 0.25	2.81±0.21	23.11±0.12	6.66±0.20	67.41	433.14
<b>BP1 Fermentat</b>	14.32± 0.12	2.41±0.10	20.71±0.10	5.94±0.14	70.94	431.01
<b>BP2 Fermentat</b>	14.65± 0.17	2.70±0.12	20.00±0.22	7.48±0.31	69.87	437.54
<b>BP3 Fermentat</b>	13.89±0.23	2.31±0.12	18.06±0.18	4.19±0.21	75.44	422.32
<b>BP4 Fermentat</b>	13.53±0.17	2.59±0.22	17.06±0.09	4.28±0.11	76.11	421.64
<b>BP5 Fermentat</b>	13.67±0.13	2.76±0.11	21.71±0.15	5.99±0.12	69.54	429.83

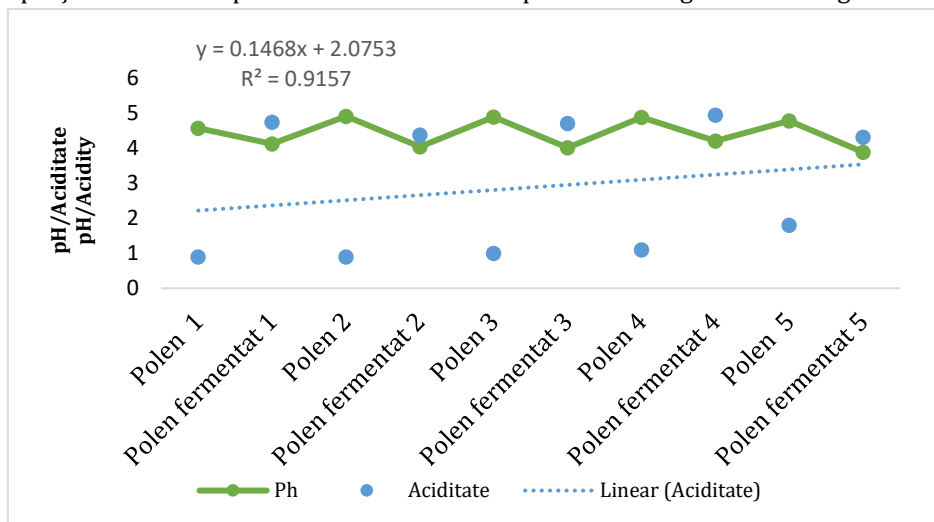
\* rezultatele reprezintă valoarea medie a trei determinări independente ± deviația standard

\*results represent the mean of three independent determination ± standard deviation

## 5.2.6 pH-ului și a acidității

### 5.2.6 pH and acidity value

pH-ul și aciditatea reprezintă doi parametri de calitate foarte importanți mai ales pentru păstură, iar determinarea acestora într-un produs obținut artificial este esențială pentru a stabili dacă a avut loc procesul fermentativ sau nu. Acești parametrii au fost determinați prin metodele descrise în capitolul Material și metode și sunt invers proporționali în cazul păsturii. Rezultatele sunt prezentate în graficul din Fig. 39.



**Fig. 41. Variația pH-ului în probelor de polen înainte și după procesul fermentativ**

Fig. 41. Variation of pH-value in bee pollen samples before and after fermentation

pH-ul obținut la finalul fermentației polenului a înregistrat valori foarte asemănătoare, neexistând diferențe semnificative între probe, valoarea medie a pH-ului a fost de 4.06, în timp ce valoarea medie inițială a polenului a fost de 4.81. În ceea ce privește aciditatea, valoarea acesteia a crescut de la valoarea medie de 1.14 meq/kg la o valoare medie de 4.64 meq/kg.

În cazul tuturor probelor de polen pH-ul a scăzut, iar aciditatea a crescut în urma procesului de fermentație, ajungând să fie similare cu cele din păstura naturală măsurate în cadrul acestei lucrări și anume pH-4.02 și aciditate 4.70 meq/kg.

Polenul fermentat diferă față de polen în ceea ce privește aciditatea și pH-ul. Valorile măsurate de (DEGRANDI-HOFFMAN și colab., 2015) pentru pH-ul păsturii au fost mai mici de 4.5.

Aciditatea produsului fermentat obținut de (ARANEDA și colab., 2014) a avut o medie de 4.33 iar aciditatea inițială a polenului a fost raportată ca având o medie de 3.04 meq/kg aciditate liberă titrabilă.

## 5.3 Rezultate și discuții privind conținutul de compuși biologic activi

### 5.3 Results and discussions regarding the biologicaly active compounds

#### 5.3.1 Conținutul de aminoacizi

##### 5.3.1 Free amino acids content

Profilului de aminoacizi liberi din probele de polen înainte și după fermentație a fost analizat prin metoda LC-MS descrisă în capitulul Material și metode.

Un număr de 28 de aminoacizi liberi au fost identificați și cuantificați prin metoda standardului intern. Analiza profilului aminoacizilor liberi a confirmat celelalte analize în vederea stabilirii indicilor calitativi ai probelor de păstură analizate.

Probele de polen fermentat au avut un conținut mai ridicat de aminoacizi liberi decât probele corespundente de polen, ceea ce dovedește ca în timpul procesului fermentativ a avut loc o hidroliză a proteinelor și astfel deși conținutul total de proteine a scăzut, acestea s-au transformat în aminoacizi în urma proteolizei. Rezultatele privind variația conținutului total de aminoacizi din probele analizate poate fi observat în fig. 40. și sunt comparabile cu rezultatele obținute pentru păstura naturală (vezi figura 12).

Valoarea cea mai ridicată a aminoacizilor din polen a fost identificată în proba BP3 (*Salvia officinalis*) și a avut o valoare de 3406.37 mg/100g, iar cea mai scăzută în proba BP2 (*Cistus sp.*) 1598.19 mg/100g. Valorile în cazul polenului fermentat au fost cuprinse între 1696.83 -3429.85 mg/100g,

În cazul conținutului de aminoacizi totali a probelor de polen este evidentă dependența de originea florală a polenului.

În probele analizate au fost identificați noua aminoacizi esențiali (treonina, metionina, lisina, histidina, valina, triptofanul, leucina, fenilalanina și isoleucină), iar proporția în care aceștia sunt prezenți în probele de polen comparativ cu polenul fermentat este evidențiată în graficul din Fig. 41.

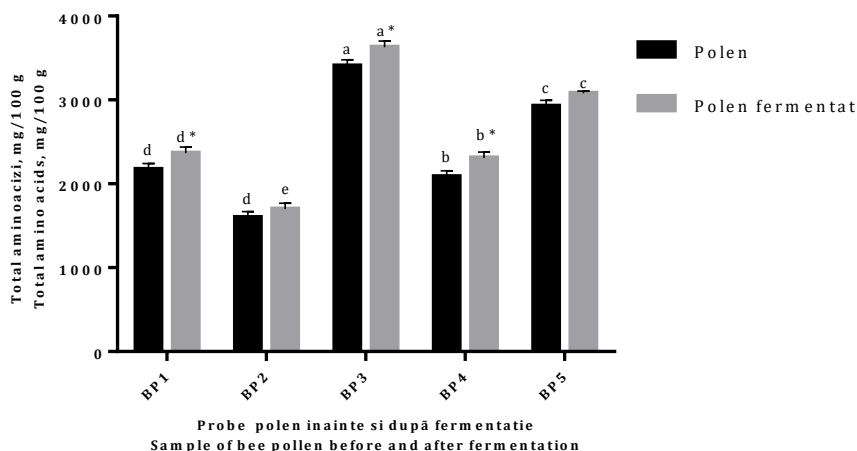
În ceea ce privește conținutul de aminoacizi esențiali, cantitatea acestora nu pare să fie influențată la fel de tare ca și în cazul precedent de originea botanică, rezultatele fiind mult mai apropiate.

Rezultatele obținute pentru polen sunt comparabile cu cele din studiul realizat de Szczêsna (2006), ar în acest studiu au fost identificați doar 17 aminoacizi și totii aminoacizii esențiali cu excepția triptofanului.

Tabalul 32 (Table 32) **Conținutul de aminoacizi liberi din probele de polen înainte și după fermentație**

*Free amino acids content of analyzed bee pollen sample before and after fermentation*

Aminoacid Amino acid Mg/100g	BP1	BP1 F	BP2	BP2 F	BP3	BP3 F	BP4	BP4 F	BP5	BP5 F
(ARG)	136.13	131.18	65.68	65.98	200.01	215.32	23.2	26.58	35.4	36.8 6
(GLN)	96.35	78.65	80.69	88.50	115.93	105.49	61.45	72.56	61.52	62.5 8
(SER)	86.51	86.57	75.90	82.90	143.7	121.35	75.54	85.68	95.35	103. 5
(ASN)	159.2	136.48	44.26	52.90	369.26	311.36	185.5 2	195.12	121.3 5	143. 5
(1-MHIS)	0.9	11.36	4.94	5.06	14.9	15.25	5.4	6.52	9.4	10.2 6
(HYP)	0.12	0.98	17.12	17.24	98.35	98.65	0	2.36	2.1	2.4
(GLY)	24.3	26.58	43.62	51.33	25.94	26.32	38.3	25.65	71.1	82.6 5
(GPR)	36	37.42	0.11	0.04	0.68	2.65	92.3	89.56	124.9	124. 86
(THR)	12.24	21.48	3.39	3.71	51.25	62.42	0.9	4.98	0	1.25
(ALA)	84.7	88.14	115.5 1	122.80	278.32	289.65	139.5	145.69	90.8	85.6 2
(HLY)	39	4.56	0.00	0.00	0	4.98	17.9	23.71	82.7	79.4 5
(GABA)	52.8	50.31	165.7 2	169.86	284.93	287.95	73.5	89.65	95.5	99.6 5
(SAR)	63.1	55.71	0.61	0.99	3.36	15.26	24.1	45.68	203.3	258. 45
(βAIBA)	157	162.45	0.00	0.00	0	0.25	204.5	230.12	202.4	151. 23
(ABA)	34.7	35.68	1.02	0.86	2.95	35.69	14.5	26.69	32.7	39.1 2
(ORN)	21.53	25.9	1.25	3.25	4.85	4.99	10.6	12.98	10.8	11.0 8
(MET)	41.25	45.12	2.09	2.35	5.59	6.81	82.6	85.69	55.6	68.6 5
(PRO)	827.75	962.54	785.9 8	807.08	1406.14	1562.35	852.3 5	913.56	956.9 9	985. 24
(LYS)	28.8	49.65	20.14	26.25	44.25	46.35	7.3	28.11	19.8	32.3 5
(ASP)	53.1	55.21	42.81	52.01	167	184.53	20.7	22.36	40.5	42.6 8
(HIS)	46.1	51.34	56.21	62.62	0.41	0.85	37.1	35.11	56	55.8 9
(TPR)	6.2	6.9	0.19	0.25	40.4	62.52	3.9	4.58	12.6	11.5 6
(VAL)	29.2	61.25	6.02	6.67	90.25	98.32	1.8	22.62	7.2	16.2 5
(GLU)	24.62	28.65	29.15	31.61	9.82	8.65	24.36	28.65	270.2	281. 35
(TRP)	5.1	1.29	2.25	4.56	12.61	10.19	12	5.6	0.9	1.2
(LEU)	34.6	68.23	11.28	12.37	13.23	28.65	45.8	45.12	148.5	169. 4
(PHE)	28	32.58	10.46	11.59	7.28	6.25	17	16.98	50	52.3 6
(ILE)	17.6	21.39	5.23	6.89	8.27	5.14	9.3	11.54	31.3	35.5 8
(TYR)	24	28.64	6.55	7.01	6.52	11.65	3	4.12	36.5	34.5 6
Total aminoacizi liberi	2170.9	2366.2 4	1598. 19	1696.68	3406.2	3629.84	2084. 42	2307.57	2925. 41	3079 .53

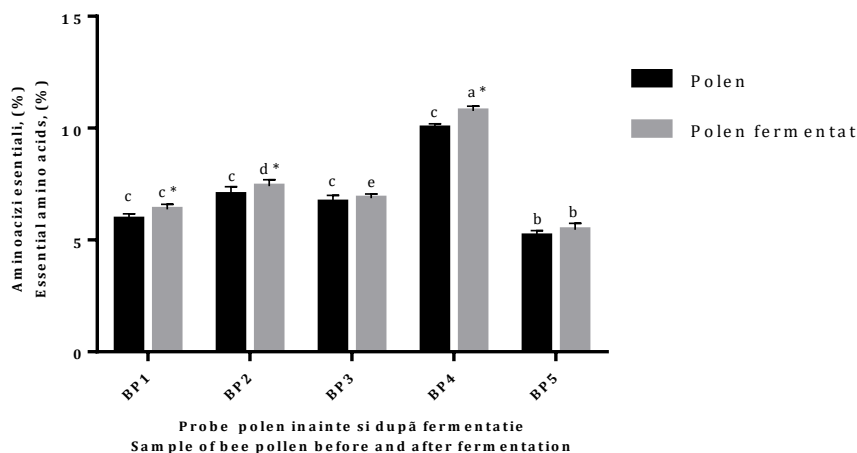


**Fig. 42. Conținutul total de aminoacizi liberi din probele de polen înainte și după fermentație**

Fig. 42. Total amino acids content from bee pollen sample before and after fermentation

\*=semnificativ diferit pentru  $p < 0.05$ .

Litere identice înseamnă diferențe nesemnificative pentru  $p < 0.05$ .



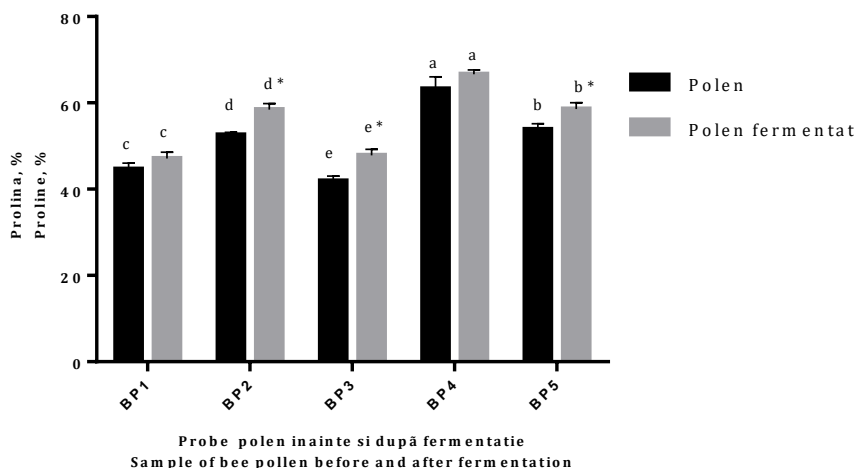
**Fig. 43. Conținutul de aminoacizi esențiali din probele de polen înainte și după fermentație**

Fig. 43. Content of essential amino acids from bee pollen sample before and after fermentation

\*=semnificativ diferit pentru  $p < 0.05$ .

Litere identice înseamnă diferențe nesemnificative pentru  $p < 0.05$ .

Dintre toti cei 28 de aminoacizi identificați, prolina a fost identificată în cantitatea cea mai mare, iar variația acesteia în probele analizate este reprezentată în figura 42,



**Fig. 44. Conținutul de prolină din probele de polen înainte și după fermentație**

Fig. 44. Proline content of bee pollen sample before and after fermentation

\*=semnificativ diferit pentru  $p < 0.05$ .

Litere identice înseamnă diferențe nesemnificative pentru  $p < 0.05$ .

Prolina, deși este sintetizată de către organismul uman, este foarte benefică în cazul efortului fizic prelungit astfel persoanele care sunt expuse efortului prelungit (ex. sportivi) pot fi nevoite să consume suplimente alimentare pe bază de prolină (WU, 2009).

Concentrația de aminoacizi și conținutul de proteine brute a fost dependent de originea florală a polenului, în schimb concentrația de aminoacizi esențiali a fost relativ constantă și nu a fost direct proporțională cu cantitatea totală de aminoacizi.

În literatura de specialitate, nu există studii comparative ale conținutului de aminoacizi ai polenului înainte și după procesul fermentativ, iar astfel rezultatele au fost comparate cu cele obținute pentru păstură și polen.

La fel ca și în păstura, în polenul și polenul fermentat s-au identificat toți aminoacizii esențiali. Cantitatea mai mare de aminoacizi este motivul pentru care păstura este considerată a avea o mai mare biodisponibilitate pentru organism și o mai mare digestibilitate.

### 5.3.2 Rezultate și discuții privind conținutul de acizi grași

#### 5.3.2 Results and discussions regarding fatty acids content

Utilizând metoda descrisă anterior în capitolul material și metode s-au identificat în probele de polen și polen fermentat 12 tipuri de acizi grași. Dintre aceștia acidul  $\alpha$  - linolenic [18:3 (n - 3)] a fost identificat în cea mai mare cantitate, variind între 14.38 și 71.28 %, urmat de acidul linoleic [18:2 (n - 6)] între 9.45 și - 39.81% și acidul palmitic (16:0) între 9 și 36.93%. Au fost determinate cantități mici (< 3 %) din

următorii acizi: capric (10:0), lauric (12:0), miristic (14:0), stearic (18:0); arahidic (20:0); eicosenic [20:1 (n - 9)]; behenic (22:0); elaidic [18:1(9t) (n - 9)].

Tabelul 33 (Table 33) **Compoziția acizilor grași (% din lipidele totale) din probele de polen înainte și după fermentație**

*Fatty acid composition (% of total fatty acids) of bee pollen sample before and after fermentation*

<i>Acid gras/ Fatty acid</i>	<i>BP1</i>	<i>BP1</i>	<i>BP2</i>	<i>BP2</i>	<i>BP3</i>	<i>BP3</i>	<i>BP4</i>	<i>BP4</i>	<i>BP5</i>	<i>BP5</i>
<b>(10:0)</b>	0.13	0.13	0.12	0.13	0.04	0.04	0.01	0.01	0.00	0.00
<b>(12:0)</b>	0.12	0.12	0.32	0.32	0.25	0.26	0.09	0.09	0.01	0.01
<b>(14:0)</b>	0.22	0.22	0.17	0.18	0.17	0.17	0.18	0.18	0.21	0.21
<b>(16:0)</b>	25.46	24.07	32.30	30.75	35.88	34.89	28.27	27.90	33.89	35.02
<b>(18:0)</b>	2.66	2.70	1.84	1.88	0.89	0.90	0.72	0.72	0.37	0.37
<b>18:1 (n-9)</b>	13.25	13.50	5.55	5.68	2.06	2.09	1.18	1.19	0.32	0.32
<b>18:1(9t) (n-9)</b>	0.00	0.00	0.48	0.49	0.06	0.06	0.02	0.02	0.00	0.00
<b>18:2 (n-6)</b>	28.68	29.21	12.91	13.20	9.17	9.32	2.47	2.49	1.53	1.50
<b>18:3 (n-3)</b>	26.85	27.36	43.38	44.37	50.81	51.60	66.18	66.52	63.34	62.26
<b>(20:0)</b>	1.11	1.13	1.74	1.78	0.08	0.09	0.13	0.13	0.04	0.04
<b>(22:0)</b>	1.15	1.17	1.06	1.08	0.58	0.59	0.62	0.62	0.21	0.21
<b>22:1 (n-9)</b>	0.38	0.39	0.13	0.13	0.00	0.00	0.13	0.13	0.00	0.07
<b>Σn-3 PUFAs</b>	26.85	27.36	43.38	44.37	50.81	51.60	66.18	66.52	63.34	62.26
<b>Σn-6 PUFAs</b>	28.68	29.21	12.91	13.20	9.17	9.32	2.47	2.49	1.53	1.50
<b>Σn-9 PUFAs</b>	13.63	13.88	5.68	5.81	2.06	2.09	1.31	1.32	0.39	0.39
<b>n-6/n-3</b>	1.07	1.07	0.30	0.30	0.18	0.18	0.04	0.04	0.02	0.02

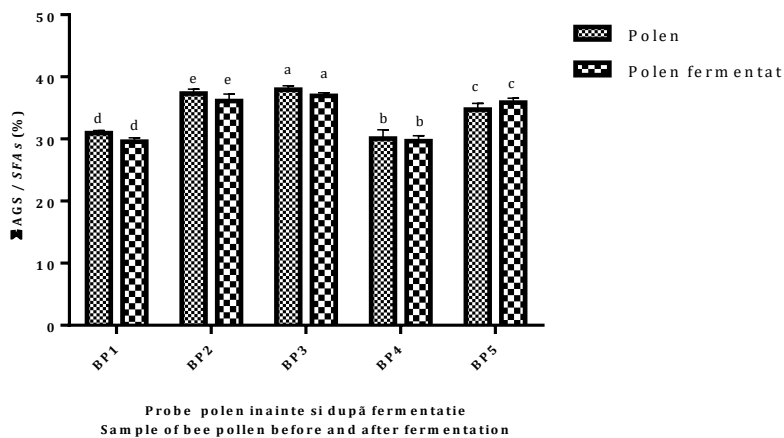
\*Rezultatele reprezintă media a trei determinări independente.

\*Results represent the mean of three independent determinations.

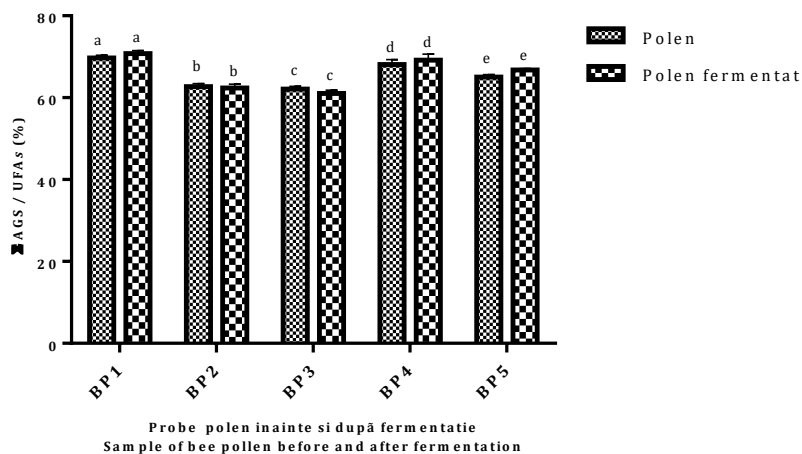
PUFAs = acizi grași polinesaturați (PUFAs-*polyunsaturated fatty acids*)

(10:0) – Acid capric; (12:0)- Acid lauric; (14:0) - Acid miristic; (16:0) - Acid palmitic; (18:0) - Acid stearic; [18:1 (n-9)] - Acid oleic; [18:1 (9 t) (n-9)] - Acid elaidic; [18:2 (n-6)] - Acid linoleic; [18:3 (n-3)] - Acid α- linolenic; (20:0) - Acid arahidic; (22:0) - Acid behenic; [22:1 (n-9)] Acid erucic.

Valorile obținute sunt în conformitate cu datele existente în literatură pentru polen (SZCZESNA, 2006), dar și cu rezultatele obținute pentru păstura naturală (vezi tabelul 9). Reprezentarea comparativă a claselor de acizi grași din totalul lipidelor identificate în probele de polen și polen fermentat sunt prezentate în graficele 43-48.

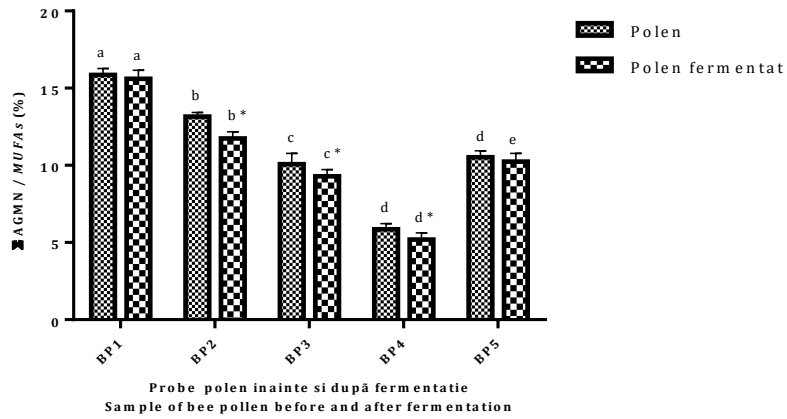


**Fig. 45. Variația acizilor grași saturați în probele de polen înainte și după fermentație**  
 Fig. 45. Variation of saturated fatty acids in bee pollen samples before and after fermentation



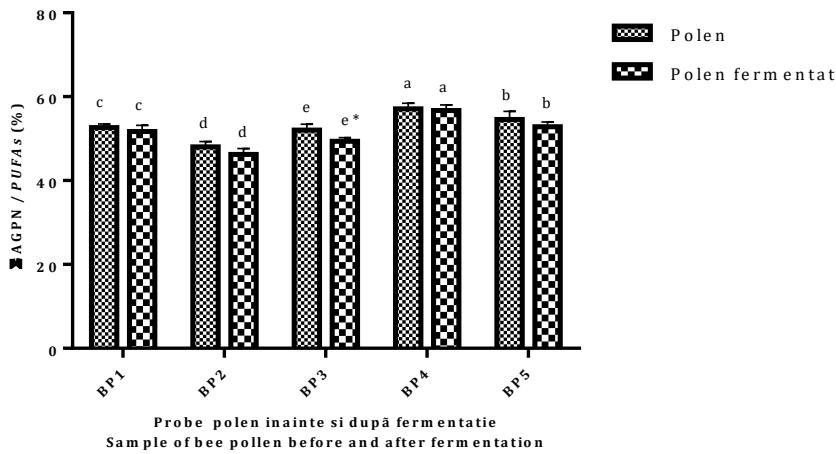
**Fig. 46. Variația acizilor grași nesaturați în probele de polen înainte și după fermentație**  
 Fig. 46. Variation of unsaturated fatty acids in bee pollen samples before and after fermentation





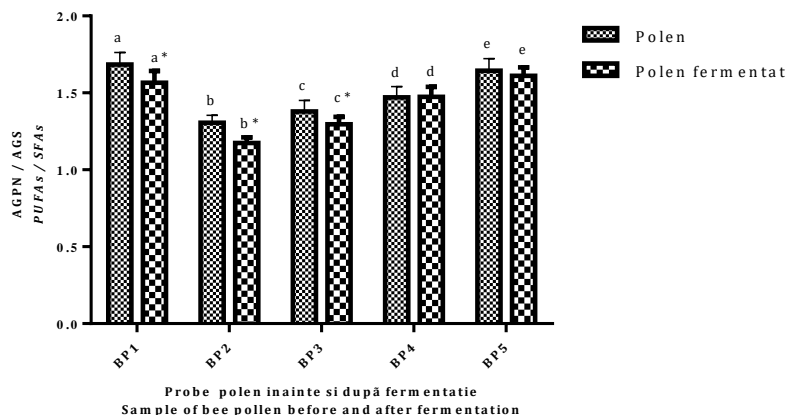
**Fig. 47. Variația acizilor grași mononesaturați în probele de polen înainte și după fermentație**

Fig. 47. Variation of MUFAs- monounsaturated fatty acids in bee pollen samples before and after fermentation



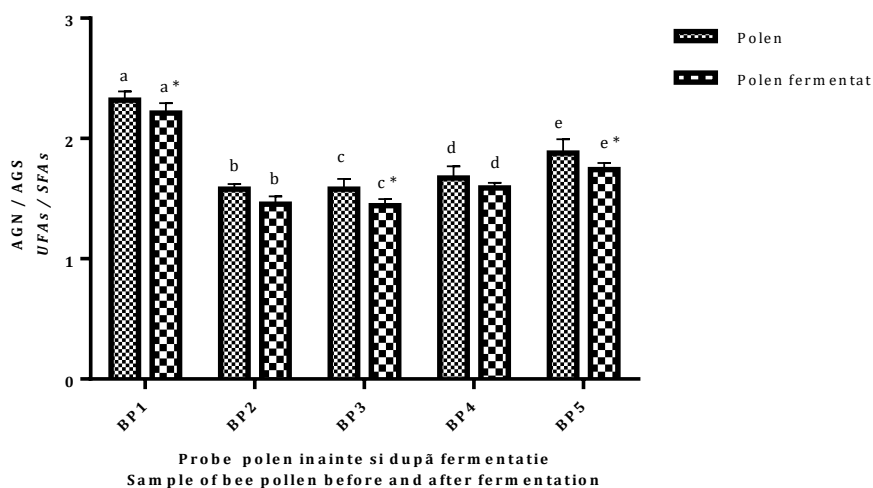
**Fig. 48. Variația acizilor grași polinesaturați în probele de polen înainte și după fermentație**

Fig. 48. Variation of PUFAs - polyunsaturated fatty acids in bee pollen samples before and after fermentation



**Fig. 49. Raportul dintre acizii grași polinesaturați și saturați în probele de polen înainte și după fermentație**

Fig. 49. Ratio of polyunsaturated fatty acids to saturated fatty acids in bee pollen samples before and after fermentation



**Fig. 50. Raportul dintre acizii grași nesaturați și saturați în probele de polen înainte și după fermentație**

Fig. 50. Ratio of unsaturated fatty acids to saturated fatty acids in bee pollen samples before and after fermentation

\*=semnificativ diferit pentru  $p < 0.05$ .

Litere identice înseamnă diferențe nesemnificative pentru  $p < 0.05$ .

Analiza statistică a claselor de acizi grași nu au arătat diferențe semnificative ( $p < 0.05$ ) între probe de polen înainte și după fermentație. Diferențe semnificative au fost observate doar între probe, cel mai probabil datorită originii botanice diferite.

Cele mai mari valori pentru acizii grași mononesaturați au fost observate în probele de polen BP1 cu polen predominant de *Ulex europaeus* și BP2 cu polen predominant de *Cistus sp.*, iar pentru cei polinesaturați în BP4 cu polen predominant de *Salix sp.*, *Prunus sp.*.

Acizii grași mononesaturați au variat cel mai tare în funcție de originea florală a probelor.

Raportul acizilor nesaturați și saturați reprezintă indice de calitate, iar în cazul polenului înainte și după fermentație, raportul dintre cantitatea acizilor neasturați și cei nesaturați au fost semnificativ mai mare în toate probele analizate.

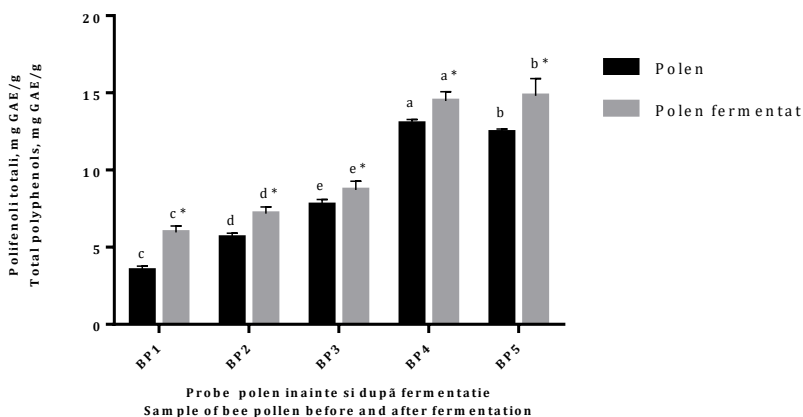
Analiza acizilor grași din polen a evidențiat faptul că fermentația pare să nu afecteze calitatea lipidelor din polen.

Rezultatele obținute pentru polenul de albine sunt în conformitate cu cele raportate de MANNING, (2015); XU și colab., (2009), MĂRGĂOAN și colab., (2014).

### 5.3.3 Conținutul de polifenoli totali

#### 5.3.3 Total polyphenols content

În lucrarea de față conținutul total de polifenoli a fost cuantificat prin metoda spectrofotometrică Folin-Ciocalteu descrisă în capitolul Material și metode. Pentru cunatificarea polifenolilor totali s-au utilizat ecuația de regresie a curbei de calibrare de acid galic:  $y=0.031x-0.0001$ ,  $R^2=0.9996$ .



**Fig. 51. Conținutul în polifenoli toali ai probelor de polen și polen fermentat**

Fig. 51. Total polyphenols content of analyzed bee pollen samples before and after fermentation

\*=semnificativ diferit pentru  $p<0.05$ .

Analiza statistică a datelor a confirmat faptul că între conținutul de polifenoli din probele de polen înaintea fermentației și după fermentație există diferențe

semnificative. Fermentarea polenului de albine a dus la creșterea cantității de polifenoli totali în toate probele testate. Cantitatea de polifenoli totali înainte de fermentație a fost între 3.49-13.01 mg/g probă, iar după fermentație între 5.95-14.47 mg/g probă. Acest aspect a fost semnalat și de KAŠKONIENĚ ŠI COLAB., (2018), care a raportat o creștere a compușilor fenolici în urma fermentației polenului de albine.

Probele de polen de care au avut polenul predominant de *Salix sp.* și *Prunus sp.*, și de *Plantago sp.*, și *Echium vulgare*, BP4 și BP5 au prezentat cantitatea cea mai ridicată de polifenoli totali, în timp ce proba BP1 – *Ulex europaeus* cea mai scăzută.

În ceea ce privește variația cantității de polifenoli totali din probele de polen aceasta este datorată origini botanice diferite și perioadei diferite de colectare (STANCIU și colab., 2016).

### 5.3.4 Conținutul de flavonoide totale

#### 5.3.4 Total flavonoid content

Conținutul de flavonoide totale a fost determinat prin metoda propusă de MĂRGHITAȘ și colab., 2009 descrisă în capitolul material și metode. Pentru cunoscerea flavonoidelor totale s-au utilizat ecuația de regresie a curbei de calibrare de quercetină:  $y=0.0003x-0.0048$ ,  $R^2=0.9998$ .

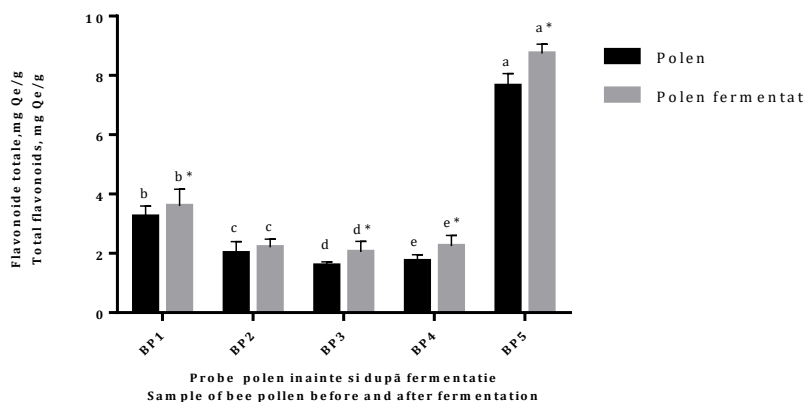


Fig. 52. Rezultate și discuții privind conținutului total de flavonoide

Fig. 52. Results and discussions regarding total flavonoid content

\*=semnificativ diferit pentru  $p<0.05$ .

În ceea ce privește conținutul de flavonoide totale rezultatele obținute au arătat că fermentația a avut efect pozitiv asupra cantității acestora. Cantitatea de flavonoide înainte de fermentație a fost între 1.58-7.67 mg / g probă, iar după fermentație între 1.0-8.73 mg / g probă. Trei dintre cele cinci probe au atins o cantitate similară de flavonoide ca și cea din păstura naturală testată. Polenul din proba BP5 predominant de *Plantago*

*sp.*, și *Echium vulgare* a avut cea mai mare cantitate de flavonoide, 7.64 mg/ g probă., iar după fermentație a ajuns la 8.73 mg / g probă.

Rezultatele obținute sunt în conformitate cu cele raportate de KAŠKONIENĖ și colab., (2018) care a testat cinci probe de polen pe care le-a supus fermentației solide cu și fără adaos de *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG). Rezultatele nu au arătat variații prea mari între probele care au fost fermentate cu adaos de LGG și cele care nu au avut adaos de LGG, diferențele fiind raportate ca nesemnificative, în schimb în ceea ce privește conținutul total de flavonoide a raportat o creștere de până la 2.5 ori a conținutului acestora.

### 5.3.5 Identificarea compușilor fenolici individuali

#### 5.3.5 Identification of individual phenolic compounds

Tehnica HPLC/DAD s-a dovedit a fi convenabilă pentru identificarea și cuantificarea compușilor fenolici predominanți din probele de polen înainte și după fermentație. Prin gradientul utilizat, eluarea compușilor fenolici cu timpi de retenție între 25 și 60 de minute a permis imediat determinarea tipului de compus fenolic. Cromatogramele obținute au fost înregistrate în domeniul lungimii de undă cuprinse între 250 și 380 nm. Pentru identificarea compușilor polifenolici au fost analizate individual spectrele care au compus cromatogramele. Fiecare compus polifenolic are un spectru de absorbție caracteristic ca formă și ca și număr de maxime (picuri de absorbție). De asemenea raportul între intensitatea acestor picuri este caracteristică pentru fiecare compus.

Pentru o identificare corectă a compușilor polifenolici s-au comparat spectrele obținute cu spectrele compușilor de referință (standarde) existenți în profilotecă precum și cu cele prezentate de către CAMPOS și MARKHAM (2007). Timpii de retenție însoțiți de spectrele de absorbție în UV constituie date precise pentru identificarea compușilor fenolici.

Analiza rezultatelor a fost făcută cu software-ul UniPoint System 2.1 care este conectat la detector, iar pentru determinare structurii fiecărei molecule s-a recurs la regulile stabilite de către CAMPOS și MARKHAM, (2007).

Detectarea picurilor, în cromatogramele probelor de păstură analizate, între 260 și 340 nm a însemnat existența flavonoidelor (flavone și flavonoli) și a unor derivați ai acidului cinamic.

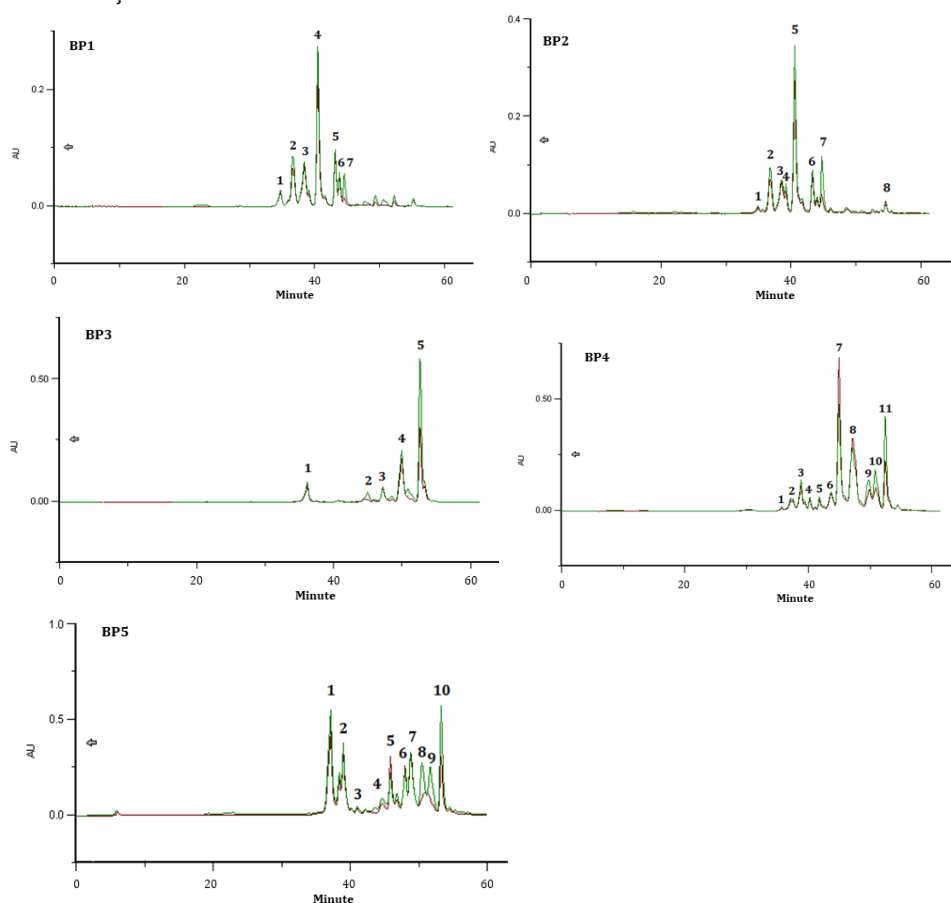
Extracția compușilor fenolici constituenți ai păsturii și anume utilizarea etanolului 50% a permis extragerea întregii game de compuși de interes (flavonoide libere, flavonoide heterozidate, acizi fenolici etc atât compuși polar cât și nepolari) și astfel diferite profile polifenolice au fost obținute în urma analizării extractelor.

Rezultatele obținute în urma analizării probelor de păstură sunt în concordanță cu rezultatele prezentate anterior pentru păstură și polen (BALTRUŠAITYTE și colab., 2007; MARKIEWICZ-ZUKOWSKA și colab., 2013; SOBRAL și colab., 2017;

TAVIDIDISHVILI și colab., 2014). Datele spectrale pentru toate probele au fost citite în intervalul 220-400 nm. Identificarea structurală a fost făcută în conformitate cu (CAMPOS ȘI; MARKHAM, 2007).

Profilurile polifenolice obținute prin analiză HPLC/DAD nu au fost afectate de proteinele și polizaharidele prezente în probele de păstură analizate. În cazul probelor analizate compușii fenolici care au eluat au dat timpi de retenție (RT) cuprinși între 30 și 55 min.

Primul pas într-o pentru identificarea compușilor fenolici implică interpretarea spectrului de absorbție pentru a determina tipul compusului și compararea cu spectrele de referință.



**Fig. 53. Profilul HPLC/DAD al probelor de polen înainte (linia roșie) și după fermentație (linia verde)**

Fig. 53. HPLC/DAD profile of bee pollen before (red line) and after fermentation (green line)

Cromatogramele obținute pentru probele BP1 și BP2 sunt foarte asemănătoare, datorită faptului că aceste probe au în componență diferite proporții de polen de *Ulex*

*europaeus*, *Cistus* sp. și *Citrus* sp. Compușii identificați, pe baza spectrelor UV, în cele două probe au fost aceeași derivați ai quercetinei, kamferolului și metilherbacetinei, variind doar concentrația acestora. 8-O-methylherbacetina-3-O-sophorosid este un marker pentru *Ulex europaeus* (MARKHAM și CAMPOS, 1996).

În polenul de *Salvia officinalis* au fost identificate două flavonoide glicozidate: herbacetina și kamferolul. În proba cu polen predominant de *Salix* sp. și *Prunus* sp. au fost identificați derivați ai quercetinei, herbacetinei și isoramnetinei, iar în proba cu polen predominant de *Plantago* sp. și *Echium vulgare* derivați ai quercetinei și herbacetinei.

Analiza cantitativă a fost efectuată pe baza curbelor de calibrare trasate pentru substanțele de referință: acid hidroxicinamic ( $R^2 = 0.997$ ), quercetină ( $R^2 = 0.996$ ) și rutină ( $R^2 = 0.998$ ). Pentru toate curbele de calibrare, p a fost mai mic de 0,001 ( $p < 0,001$ ).

Tabelul 34 (Table 34)

**Compușii fenolici identificați în cromatogramele HPLC/DAD ale porobelor BP1-BP5***Identified phenolic compounds in HPLC/DAD chromatogram of samples BP1-BP5*

Pic Peak	Timp de retenție Retention time (RT)	Compus fenolic (atribuire pe baza spectrului UV) Phenolic compound (assignment based on UV spectrum)	Polen Cantitate, mg/g Quantity, mg/g	Polen fermentat Cantitate, mg/g Quantity, mg/g
<b>BP1</b>				
1	34.76	Quercetină-3-O- glicozid	0.40	0.41
2	36.62	Kaempherol-3-O- glicozid	0.62	0.72
3	38.4	Kaempherol-3-O- glicozid	0.50	0.54
4	39.1	8-O-methylherbacetin-3-O-sophoroside	1.26	1.53
5	40.5	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.78	0.79
6	43.15	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.59	0.62
7	43.83	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.38	0.49
<b>BP2</b>				
1	36.77	Quercetină-3-O- glicozid	0.16	0.18
2	38.52	Quercetină-3-O- glicozid	0.44	0.61
3	39.22	Kaempherol-3-O- glicozid	0.50	0.48
4	40.57	8-O-methylherbacetin-3-O-sophoroside	0.41	0.46
5	43.28	Derivat al acidului hidroxicinamic	3.48	3.79
6	44.01	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.52	0.58
7	44.72	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.41	0.88
8	54.35	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.28	0.29
<b>BP3</b>				
1	36.16	Herbacetină-3-O- glicozid	0.76	0.76
2	47.21	Kaempherol-3-O- glicozid	0.22	0.32
3	49.94	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.32	0.32
4	52.62	Derivat al acidului hidroxicinamic	2.55	2.68
5	53.29	Derivat al acidului hidroxicinamic	4.85	4.38
<b>BP4</b>				
1	38.81	Quercetină-3,6-O- glicozid	0.11	0.09
2	39.44	Herbacetină-3-O- glicozid	0.26	0.27
3	40.21	Isoramnethină-3-O- glicozid	0.61	0.87

4	41.78	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.21	0.21
5	43.69	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.23	0.22
6	44.95	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.25	0.26
7	47.15	Derivat al acidului hidroxicinamic	4.32	4.69
8	49.88	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.92	0.87
9	50.91	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.43	0.66
10	52.46	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.41	0.59
11	53.08	Derivat al acidului hidroxicinamic	1.98	2.58
<b>BP5</b>				
1	37.12	Quercetină-3,6- <i>O</i> - glicozid	4.12	4.88
2	38.96	Quercetină-3- <i>O</i> - glicozid	2.21	2.51
3	41	Herbacetină-3- <i>O</i> - glicozid	0.31	0.31
4	44.64	Herbacetină-3- <i>O</i> - glicozid	0.71	0.81
5	45.83	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.97	0.81
6	46.75	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.48	0.45
7	47.97	Derivat al acidului hidroxicinamic	1.35	1.35
8	48.82	Derivat al acidului hidroxicinamic	1.03	2.03
9	50.54	Derivat al acidului hidroxicinamic	0.61	1.61
10	51.63	Derivat al acidului hidroxicinamic	3.12	3.70

În toate probele analizate au fost identificați, pe lângă flavonoidele menționate, derivați ai acidului cinamic. Derivații acidului hidroxicinamic au fost prezenți în aceste probe în cele mai mari cantități, în timp ce flavonoidele cum ar fi kamferolul-3-*O*-glicozidic, quercetina -3-*O*-glicozid și Herbacetina-3-*O* glicozid au fost prezente într-o proporție mai mica. Proprietățile antioxidante puternice ale derivaților acidului hidroxicinamic au fost descrise de SILVA și colab., (2000), iar pentru aceste probe potențialul este similar.

În toate probele analizate se poate observa o creștere a compușilor flavonoidici în probele de polen fermentat. În ceea ce privește derivații acidului hidroxicinamic creșterea este și mai evidentă. Rezultatele sunt în conformitate cu cele obținute pentru polifenolii și flavonoidele totale pentru aceste probe.

Analiza HPLC/DAD a compușilor fenolici este extrem de eficientă pentru aprecierea calității compușilor fenolici din compoziția unei probe, aspect care pare sa conteze mai mult în ceea ce potențialul biologic al probei decât cantitatea acestora.

## 5.4 Rezultate și discuții privind activitatea antioxidantă

### 5.4 Results and discussions regarding antioxidant activity

Activitatea antioxidantă a polenului înainte și după fermentație s-a testat folosind un ansamblu de trei metode complementare: DPPH, TEAC și FRAP.

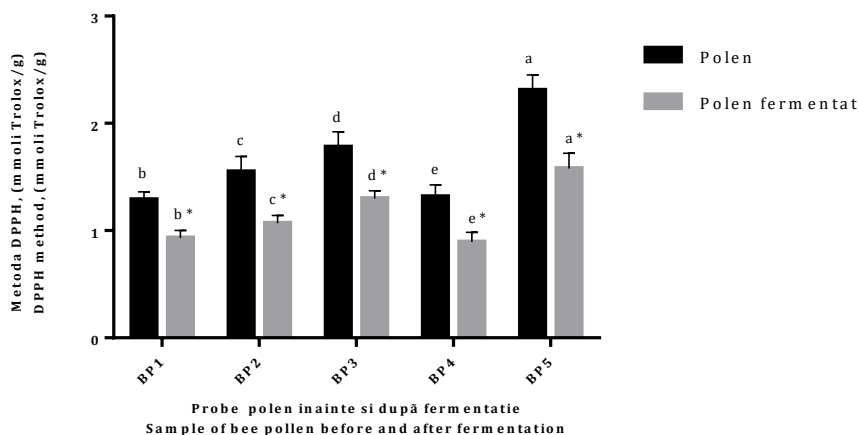
SAKANAKA ȘI ISHIHARA, (2008) și CHANG și colab., (2002) sugerează faptul că doar prin testarea a cel puțin două metode antioxidante se poate caracteriza cât mai complet potențialul antioxidant al unei probe. Abordarea complementară a acestei analize s-a realizat în ideea comparării și corelării rezultatelor obținute.



## 5.4.1 Metoda DPPH

### 5.4.1 DPPH method

Testarea capacității de captare a radicalului liber DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) s-a realizat cu ajutorul metodei spectrofotometrice descrise în capitolul „Material și metodă”. Pentru cunoscerea capacității antioxidante prin metoda DPPH s-a utilizat ecuația de regresie a curbei de calibrare a Trolox-ului:  $y=11.01x+0.651$ ,  $R^2=0.9995$ .



**Fig. 54. Capacitatea antioxidantă a probelor de polen de albine înainte și după fermentație evaluată prin metoda DPPH**

Fig. 54. Antioxidant capacity of bee pollen samples before and after fermentation evaluated through DPPH  
 \*=semnificativ diferit pentru  $p<0.05$ .

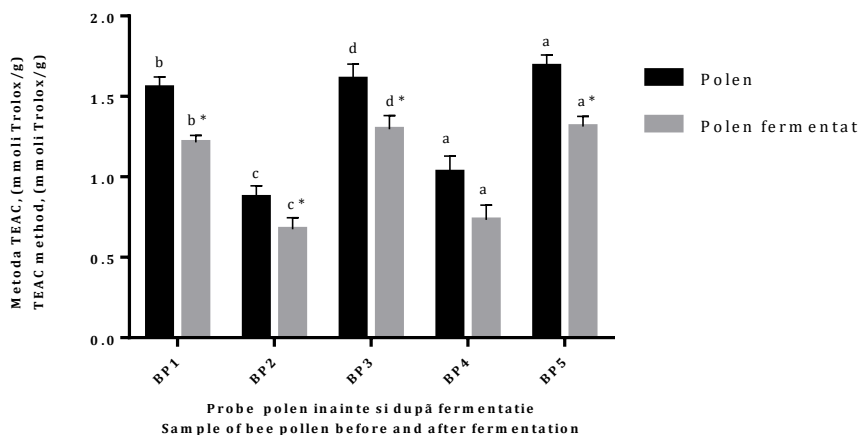
Capacitatea antioxidantă testată prin metoda DPPH a variat în funcție de originea botanică a polenului. Proba de polen în care a fost identificat polen de *Plantago sp.* și *Echium vulgare* a avut cel mai bun efect antioxidant, urmat de cel de *Salvia officinalis*.

În ceea ce privește activitatea antioxidantă a probelor de polen fermentat, s-a constatat o scădere a acesteia de 2.0-5.5 ori în toate probele.

## 5.4.2 Metoda TEAC

### 5.4.2 TEAC method

Testarea capacității de captare a radicalului liber ABTS s-a realizat cu ajutorul metodei spectrofotometrice descrise în capitolul „Material și metodă”. Rezultatele au fost calculate pe baza curbei de calibrare a Troloxului și s-a utilizat ecuația de regresie a curbei de calibrare:  $y=18.71x+1.52$ ,  $R^2=0.9998$ .



**Fig. 55. Capacitatea antioxidantă a probelor de polen de albine înainte și după fermentație evaluată prin metoda TEAC**

Fig. 55. Antioxidant capacity of bee pollen samples before and after fermentation evaluated through TEAC

\*=semnificativ diferit pentru  $p < 0.05$ .

Capacitatea de captare a radicalului ABTS a probelor de polen a fost semnificativ ( $p < 0.05$ ) mai ridicată în cazul probelor de polen decât în probele de polen fermentate. Probele de polen testate prin această metodă au demonstrat o variabilitate foarte mare a capacității antioxidante.

Probele cu polen predominant de *Plantago sp.* și *Echium vulgare*, *Salvia officinalis* și *Ulex europaeus* au prezentat cele mai bune valori antioxidante,

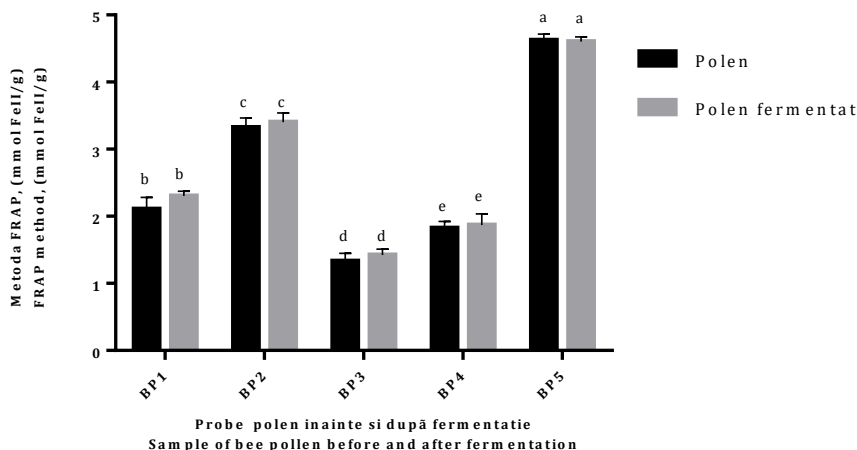
În studiul realizat de KAŠKONIENĖ și colab., (2018) care compară pentru prima oară în literatură compușii fenolici ai polenului fermentat și activitatea antioxidantă a acestuia raportează, de asemenea, o scădere a capacității antioxidante a probelor fermentate.

### 5.4.3 Metoda FRAP

#### 5.4.3 FRAP method

Potențialul antioxidant total (FRAP) s-a determinat utilizând metoda descrisă în capitolul „Material și metodă”. Pentru metoda FRAP, rezultatele au fost calculate pe baza curbei de calibrare trasată cu ajutorul soluțiilor de concentrație cunoscută de  $\text{FeSO}_4$ :  $y = 0.53271x - 0.004$ ,  $R^2 = 0.9998$ , rezultatele fiind exprimate în  $\text{mmol Fe}^{II}/\text{g}$ .

Capacitatea de reducere a ionului feric, testată prin metoda FRAP, a înregistrat valori foarte diferite pentru probele analizate.



**Fig. 56. Capacitatea antioxidantă a probelor de polen de albine înainte și după fermentație evaluată prin metoda FRAP**

Fig. 56. Antioxidant capacity of bee pollen samples before and after fermentation evaluated through FRAP

\*=semnificativ diferit pentru  $p < 0.05$ .

Spre deosebire de celelalte două metode testate, în cazul metodei FRAP s-a constatat o creștere a potențialului antioxidant la probele de polen fermentat ceea ce indică faptul că modificările biochimice suferite de polen, afectează într-un mod pozitiv capacitatea antioxidantă a acestui produs. Cel mai bun efect antioxidant l-a avut proba cu polen predominant de *Plantago sp.* și *Echium vulgare*, *Cistus sp.* și *Ulex europaeus*.

Deși conținutul de polifenoli și flavonoide a crescut în probele de polen fermentat s-au înregistrat scăderi ale capacității antioxidante testate prin metodele DPPH și TEAC și creșterea capacității de captare a radicalului feric. Aceste observații sunt extrem de interesante și dovedesc faptul că, pe lângă cantitatea compușilor polifenolici un aspect important îl constituie calitatea acestora. De asemenea este întărită ideea conform căreia potențialul antioxidant este dat și de alte substanțe din componența unei probe.

Comparând rezultatele obținute prin cele trei metode se poate concluziona că efectul antioxidant pare să depindă mai puțin de cantitatea de compuși fenolici și mai mult de calitatea acestora, deoarece aceeași cantitate de polifenoli și flavonoide a dus la rezultate diferite în funcție de tipul de radical testat.

MĂRGHITAȘ și colab., (2009) indică, de asemenea, că există o mare variabilitate în ceea ce privește corespondența dintre activitatea antioxidantă și conținutul total de polifenoli din polenul cu origini botanice diferite, ceea ce a fost relatat anterior și de CAMPOS și colab. (2003) care a dat o informație utilă, care contribuie la identificarea taxonomică a polenului analizat.

## 5.5 Rezultate și discuții privind activitatea antimicrobiană

### 5.5 Results and discussions on antimicrobial activity

Activitatea antimicrobiană a probelor de polen a fost testată prin metoda descrisă în capitolul Material și metode. Rezultatele obținute pentru tulpinile gram negative (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*) și pentru cele gram pozitive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus laterosporus*, *Paenibacillus larvae*, *Paenibacillus alvei*, *Enterococcus faecalis*) sunt sintetizate în graficele din Fig. 55-57. Pentru realizarea extractelor s-a utilizat apa ca și solvent, iar diluțiile s-au realizat direct în bulionu nutritiv.

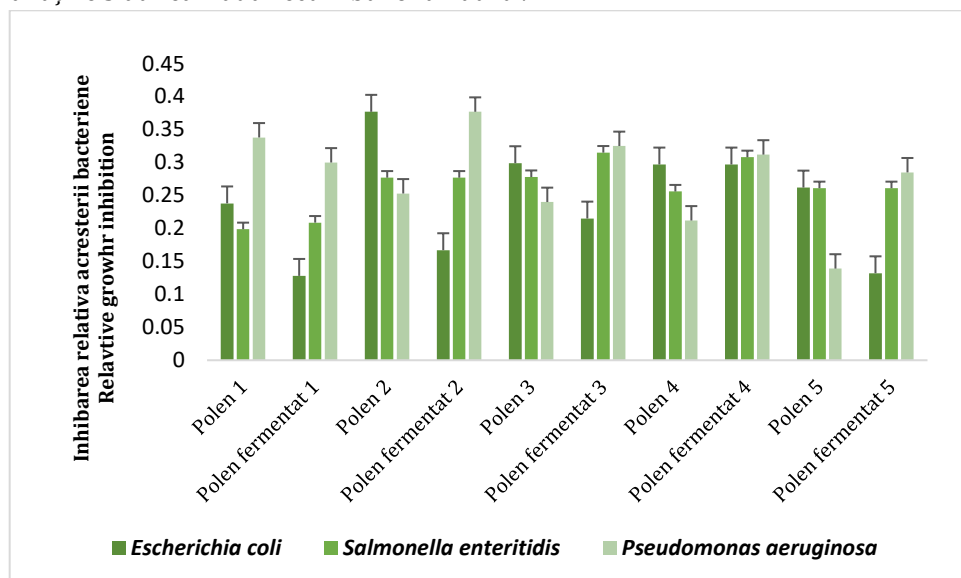


Fig. 57. Inhibarea relativă a creșterii bacteriene în dependență de extractul utilizat

Fig. 57. Relative growth inhibition in dependence of the extract used

Efectul antibacterian, la fel ca și cel antioxidant pare să depindă mai puțin de cantitatea de compuși fenolici și mai mult de calitatea acestora. Compușii fenolici pot influența creșterea și metabolismul bacteriilor, dar ei pot avea fie un efect inhibitor, fie un efect stimulator, în funcție de concentrația și de tipul de compus fenolic (ESTEVINHO și colab., 2008; MORAIS și colab., 2011).

În ceea ce privește bacteriile gram negative, cel mai bun efect antimicrobian l-a avut proba BP2 care a avut în componență polen predominant de *Cistus sp.* și proba BP4 (*Salix sp.*, *Prunus sp.*) împotriva tulpinilor de *Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa*.

Activitatea antimicrobiană, la fel ca și activitatea antioxidantă, pare să nu fie influențată de cantitatea de polifenoli din probă, ci mai degrabă de calitatea acestora.

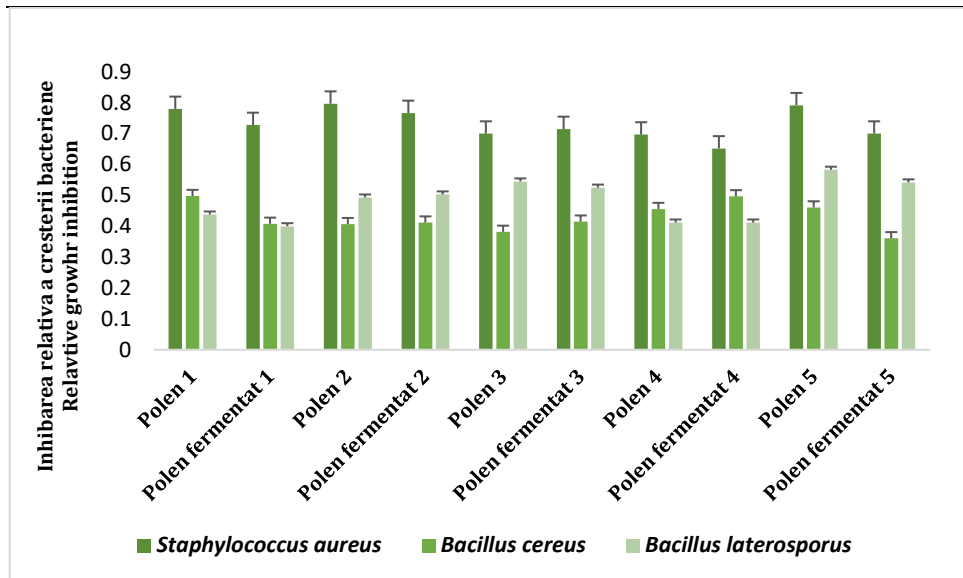


Fig. 58. Inhibarea relativă a creșterii bacteriene în dependență de extractul utilizat

Fig. 58. Relative growth inhibition in dependence of the extract used

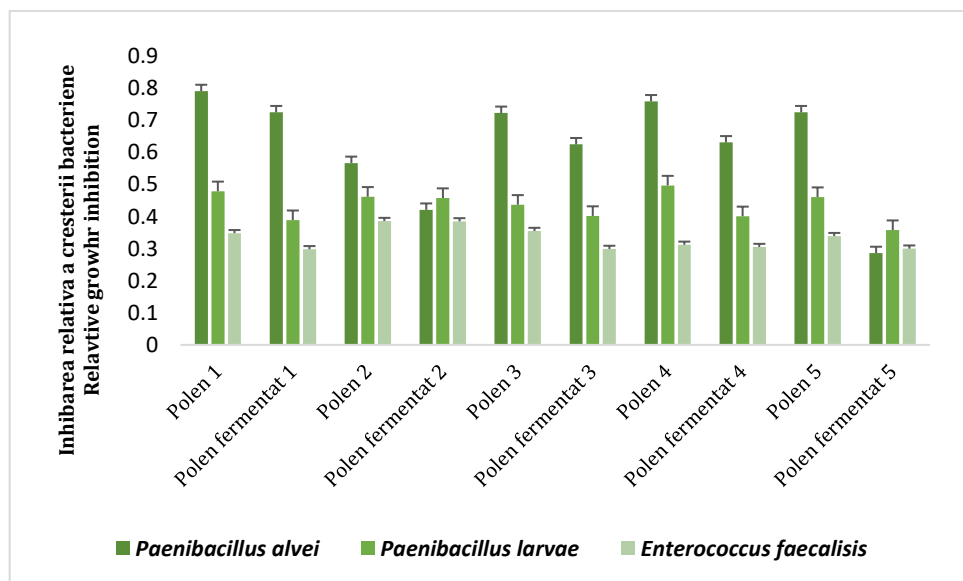


Fig. 59. Inhibarea relativă a creșterii bacteriene în dependență de extractul utilizat

Fig. 59. Relative growth inhibition in dependence of the extract used

Efectul antimicrobian al probelor de polen și polen fermentat a fost comparabil, dar tendința pe alocuri, în funcție de tulpina testată, a fost să apară un efect antimicrobian mai ridicat în cazul polenului nefermentat.

Activitatea antimicrobiană, la fel ca și activitatea antioxidantă, pare să nu fie influențată de cantitatea de polifenoli din probă, ci mai degrabă de calitatea acestora.

Acțiunea antimicrobiană a fost și în acest caz mai mare asupra bacteriilor Gram-pozitive, în timp ce bacteriile Gram-negative au prezentat o sensibilitate mai scăzută la acțiunea extractelor testate în acest studiu. Bacteriile gram-pozitive care au prezentat cea mai mare sensibilitate la extractele testate au fost *Staphylococcus aureus* și *Paenibacillus alvei*, iar dintre cele gram-negative polenul fermentat a avut cel mai bun efect împotriva *Pseudomonas aeruginosa*, iar polenul împotriva *E. coli*.

Rezultate similare ale acțiunii antimicrobiene a polenului au obținut și FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ și colab., (2013); MORAIS și colab., (2011); KACÁNIOVÁ și colab., (2012) pentru polenul din Slovacia și Portugalia.

## 6. Concluzii și recomandări

### 6. Conclusions and recommendations

Concluziile care au rezultat în urma analizelor efectuate în cadrul tezei de doctorat „Evaluarea potențialului bioactiv al păsturii” sunt formulate din perspectiva celor două direcții principale de cercetare și sunt redată în cele ce urmează:

#### 6.1 Concluzii privind păstura naturală

##### 6.1 Conclusions regarding natural bee bread

În urma analizelor efectuate pentru atingerea obiectivelor propuse și care privesc studiul păsturii naturale s-au remarcat următoarele:

Conținutul de apă al probelor de păstură analizate a fost cuprins în intervalul 7.35 – 17.79%, valori ce au depins în cea mai mare parte de proveniența probelor analizate (apicultori sau comerț), iar conținutul de cenușă s-a încadrat în intervalul 2.44– 4.02%, în dependență de originea geografică.

Păstura este o sursă excelentă de proteine, iar rezultatele obținute în cadrul acestui studiu confirmă acest aspect, valorile obținute fiind cuprinse între 18.5 și 24.0%. Proteinele din păstură au o valoare nutritivă ridicată, iar raportul echilibrat dintre aminoacizii esențiali și cei neesențiali îi cresc această valoare și îi dau o mai bună biodisponibilitate. Prezența tuturor aminoacizilor esențiali (metionina, lisina, histidina, valina, triptofanul, leucina, fenilalanina, treonină și isoleucină) oferă acestui produs al stupului o valoare biologică superioară și fac din păstură un excelent supliment alimentar.

Păstura conține o cantitate relativ ridicată de lipide, între 4.89 – 14.74%, dintre care peste 70% reprezintă acizi grași nesaturați și polinesaturați. Dintre aceștia cel mai abundent a fost acidul  $\alpha$ -linolenic [18:3 (n-3)], variind între 18.11 % și 82.77 %, urmat de acidul linoleic [18:2 (n-6)] (3.09 % - 34.09 %).

Conținutul de glucide al păsturii variază în limite foarte largi în funcție de originea botanică a probei. Dintre glucidele simple fructoza a fost identificată în cantitatea cea mai ridicată, urmată de glucoză. În probele studiate nu a fost identificată prezența zaharozei. Raportul fructoză/glucoză pentru probele de păstură analizate a fost cuprins între 1.28 și 2.18.

Valoare energetică a păsturii este în stransă dependență de conținutul de lipide, proteine și carbohidrați și a fost cuprinsă între 424.58 și 473.45 kcal/100 g. Originea botanică a păsturii este un factor decisiv care influențează valoarea nutrițională a acesteia.

Variabilitatea concentrației compușilor fenolici (polifenoli totali și flavonoide totale) ai probelor de păstură analizate reflectă compoziția specifică speciei florale. În felul acesta se pot explica valorile diferite obținute, în cadrul analizelor efectuate, de la o probă la alta, în dependență de speciile florale de proveniență a polenului.

Profilul fenolic al fiecărei probe analizate reprezintă amprenta caracteristică specie florale de proveniență a polenului.

Profilul flavonoidic al păsturii a fost constituit în general din flavonoide glicozidate, în special flavonoli glicozidați și din derivați ai acidului cinamic.

Studiind profilul HPLC/DAD al probelor de păstură analizate se poate observa predominanța derivaților glicozidici de kamferol, quercetină, herbacetină și isoramnetină. În ceea ce privește acizi fenolici, au predominat derivații acidului cinamic.

Rezultatele obținute pentru probele de păstură au fost comparate cu studiile anterioare efectuate pe probe de polen de *Brassica* din alte țări (Brazilia, Portugalia, Slovacia și Sultanatul Oman) și toate au dat un profil HPLC / DAD al compozițiilor fenolice și polifenolice identic. În plus, un alt aspect important este acela că, concentrația de flavonoide și acizi fenolici a fost aproape identică în toate probele analizate și chiar similară pentru probele cu aceeași sursă florală.

Toate rezultatele susțin afirmația că polifenolii sunt markeri chemotaxonomici pentru plante și fac analiza HPLC / DAD a profilului polifenolic, o analiză capabilă să identifice originea botanică a unei probe prin simpla analiză a spectrului obținut care a dat o amprentă unică, chiar și pentru păstură.

Acțiunea antimicrobiană a fost mare la bacteriile Gram-pozitive, în timp ce bacteriile Gram-negative au prezentat oarecare rezistență la concentrațiile de păstură testate în acest studiu. Bacteriile gram-pozitive *Staphylococcus aureus* și *Paenibacillus alvei* au prezentat cea mai mare sensibilitate la extractele de păstură testate, iar dintre cele gram-negative *Pseudomonas aeruginosa*.

Variabilitatea capacității antioxidante a probelor de păstură este dată de compoziția diferită în compuși antioxidanți a polenului care alcătuiește probele analizate. Potențialul antioxidant depinde foarte mult de condițiile specifice fiecărui sistem testat.

Cantitatea de polifenoli și flavonoide totale nu poate constitui un criteriu pentru estimarea capacității antioxidante sau antimicrobiene a unei probe studiate, întrucât aceste efecte nu se limitează doar la compușii fenolici conținuți, la acestea putând să aducă o contribuție semnificativă și alți compuși precum carotenoidele, acizii grași, vitaminele, etc.

Păstura vine cu un aport ridicat de proteine și aminoacizi esențiali, acizi grași mono- și polinesaturați și o cantitate ridicată de polifenoli și flavonoide, fiind un produs al stupului cu o biodisponibilitate ridicată. Putem concluziona faptul că păstura poate fi considerată și utilizată ca și un supliment alimentat, aducând un aport de substanțe biologice importante pentru organismul uman.

## 6.2 Concluzii privind polenul fermentat

### 6.2 Conclusions regarding fermented bee pollen

Produsele naturale, precum și cele care asigură doza zilnică de nutrienți au câștigat o importanță comercială tot mai mare în ultimii ani, iar păstura a câștigat din ce în ce mai mult popularitate printre consumatori în ultima perioadă. Datorită faptului că



metodele de extracție sunt extrem de invazive, implicand distrugerea fagurelui, iar randamentului de extracție al păsturii din stup este unul foarte mic, întrucât albinele folosesc păstura drept sursă de hrană, s-au căutat metode alternative pentru obținerea acestui produs. Cea mai la îndemână variantă pentru obținerea unui produs tip păstură este simularea procesului de fermentație care are loc în mod natural în stup.

În urma analizelor efectuat pentru atingerea ultimului obiectiv care presupune studiul influenței fermentației asupra calităților nutritive și a compușilor biologic activi din polen s-au remarcat următoarele aspecte:

În ceea ce privește conținutul de apă al probelor de polen fermentat s-a constatat o pierdere a umidității în urma procesului fermentativ de aproximativ 20%. Legat de conținutul de cenușă acesta a rămas constant, între 2.44% și 2.89% și nu a fost influențat de procesul fermentativ la care a fost supus polenul, variațiile dintre probe fiind datorate doar originii diferite a probelor analizate.

Probele de polenul fermentat a avut un conținut de proteine ușor mai scăzut decât probele de polen din care au fost obținute. În schimb, în ceea ce privește conținutul de aminoacizi, probele fermentate au avut un conținut mai ridicat de aminoacizi liberi decât probele coresopndente de polen, ceea ce dovedește ca în timpul procesului fermentativ a avut loc o hidroliză a proteinelor. Cantitatea mai mare de aminoacizi este motivul pentru care păstura este considerată a avea o mai mare biodisponibilitate pentru organism și o mai mare digestibilitate. La fel ca și în păstura, în polen și polenul fermentat s-au identificat toți aminoacizii esențiali.

Conținutul de lipide polenul fermentat a fost aproximativ egal cu polenul din care a fost produs, diferențele dintre probele de polen și cele de polen fementat fiind foarte mici. În schimb deși conținutul de acizi grași mononesaturați și polinesaturați a fost ușor mai scăzut în cazul polenului fermentat, analiza statistică nu a arătat diferențe semnificative între polenul fermentat și corespondentul acestuia astfel se poate concluziona că fermentația pare să nu afecteze calitatea lipidelor din polen.

Conținutul de glucide din polenul fermentat a fost mai scăzut datorită consumului acestora în timpul fermentației. În cazul fructozei și a glucozei s-au observat principalele diferențe. În probele studiate nu a fost identificată prezența zaharozei.

Diferențele cele mai mari au fost constatate în cazul pH-ului și a acidității. Polenul fermentat a avut o valoare a pH-ului mult mai scăzută (toate probele au avut un pH sub 4.3) decât polenul de albine și o valoare a acidității mult mai ridicată (peste 4.5 meq/kg) respectând regula conform căreia acești doi parametri sunt invers proporționali.

Fermentarea polenului de albine a dus la creșterea cantității de polifenoli totali și de flavonoide flavonoide totale cu 1-2.5 ori în toate probele testate. Rezultatele au fost similare cu cele obținute de KAŠKONIENĚ ȘI COLAB., 2018 în probele de polen fermentate cu și fără adaos de bacterii lactice.

Cu toate acestea, s-a constatat o reducere semnificativă a capacității antioxidante, testate prin metoda DPPH și TEAC, în schimb în cazul testării capacității antioxidante prin metoda FRAP s-a constatat o creștere a potențialului antioxidant.

Efectul antimicrobian al probelor de polen și polen fermentat a fost comparabil, dar tendința pe alocuri, în funcție de tulpina testată, tendința este să apară un efect antimicrobian mai ridicat în cazul polenului nefermentat.

Acțiunea antimicrobiană a fost și în acest caz mai mare la bacteriile Gram-pozitive, în timp ce bacteriile Gram-negative au prezentat o sensibilitate mai scăzută la acțiunea extractelor testate în acest studiu. Bacteriile Gram-pozitive care au prezentat cea mai mare sensibilitate la extractele testate au fost *Staphylococcus aureus* și *Paenibacillus alvei*, iar dintre cele Gram-negative polenul fermentat a avut cel mai bun efect împotriva *Pseudomonas aeruginosa*, iar polenul împotriva *E. coli*.

Toate acestea demonstrează că polenul fermentat poate fi utilizat ca și supliment alimentar aducând un aport de substanțe biologice importante pentru organismul uman.

Polenul de albine este un substrat adecvat pentru fermentația în stare solidă, deoarece are toate substanțele nutritive necesare pentru a asigura o creștere eficientă a microorganismelor și, conform rezultatelor obținute, polenul de albine este un substrat potrivit pentru realizarea acestui bioproces la nivel industrial.

## **Elementele de originalitate ale tezei**

### **Originality elements of the thesis**

Elementele de originalitate ale prezentei teze de doctorat sunt:

- ✓ Studiul profilului polifenolilor din păstura românească, utilizând metoda HPLC/DAD;
- ✓ Dovedirea corelației între originea botanică și compușii polifenolici prin studiul profilului polifenolilor din polen provenit de la plante de *Brassica napus* și din probe de păstură care au avut în componență predominant polen de *Brassica napus* (peste 97%).
- ✓ Studiul influenței procesului de fermentație asupra calităților nutritive și a compușilor biologic activi din polen prin utilizarea unor tehnici avansate (HPLC/DAD, LC/MS, GC/MS).
- ✓ Studiul comparativ al acizilor grași și al aminoacizilor din polen înainte și după fermentație.
- ✓ Studiul comparativ al activității antimicrobiene din polen înainte și după fermentație.

## Perspective de viitor

### Future perspective

Din cercetările realizate în cadrul prezentei teze de doctorat se desprind următoarele direcții noi de cercetare:

- Optimizarea protocolului de producere a păsturii artificiale pentru obținerea unui produs cu calități superioare celui natural (conținut mai mare de aminoacizi sau vitamine sau acizi grași) și brevetarea acestuia;
- Efectuarea de studii de analiză senzorială a acestui produs și dezvoltarea de alternative pentru îmbunătățirea acestuia sau pentru includerea în alte tipuri de alimente care fac deja parte din spectrul de consum al populației;
- Evaluarea a potențialului probiotic al păsturii naturale și al păsturii artificiale prin tehnici *in vitro* și *in vivo* și testarea digestibilității acestui produs;
- Studiul acesta poate fi reprodus cu diferite probe de păstură din diferite țări, odată ce sunt confirmate constatările anterioare și anume că originea botanică influențează conținutul de polifenoli al polenului de albine și apariția specifică a acestora în încărcăturile de polen monofloral, dar și faptul că pot fi polifenoli considerați un instrument extrem de util pentru identificarea originii botanice a polenului.
- Stabilirea unor parametri de calitate pentru standardizarea păsturii românești.

## Bibliografie

## References

1. ABDEL-RAHMAN, M.A., YUKIHIRO T., KENJI S., 2011, Lactic Acid Production from Lignocellulose-Derived Sugars Using Lactic Acid Bacteria : Overview and Limits, *Journal of Biotechnology* 156(4): 286–301.
2. ABOUDA, Z., ZERDANI, I., KALALOU, I., FAID, M., AHAMI, M.T., 2011, The Antibacterial Activity of Moroccan Bee Bread and Bee-Pollen (Fresh and Dried) against Pathogenic Bacteria, *Research Journal of Microbiology* 6(4): 376–84.
3. AKHMETOVA, R., SIBGATULLIN, GARMONOV, J. AKHMETOVA. S. L., 2012, Technology for Extraction of Bee-Bread from the Honeycomb, *Procedia Engineering* 4: 1822–25.
4. ALMEIDA-MURADIAN, L. B., PAMPLONA, L.C. SÍLVIA COIMBRA, ORTRUD MONIKA BARTH, 2005, Chemical Composition and Botanical Evaluation of Dried Bee Pollen Pellets. *Journal of Food Composition and Analysis* 18(1): 105–11.
5. GONZALEZ PARAMAS, A.M., GOMEZ BAREZ, A., CORDO MARCOS, C., GARICA-VILLANOVA, R.J., SANCHEZ SANZHEZ, J., 2006, Food Chemistry HPLC-Fluorimetric Method for Analysis of Amino Acids in Products of the Hive (Honey and Bee-Pollen) *Food Chemistry* 95(95): 148–56.
6. ANĐELKOVIĆ, B., JEVTIĆ, G., MLADENOVIĆ, M., MARKOVIĆ, J., PETROVIĆ, M., NEDIĆ, N. 2012, Quality of pollen and honey bee bread collected in spring. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 1, 275–277.
7. ANDERSON, K. E., CARROLL, M. J., SHEEHAN, T., MOTT, B. M., MAES, P., CORBY-HARRIS, V. 2014, Hive-stored pollen of honey bees: Many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Molecular Ecology*, 23, 23, 5904–5917.
8. Araneda Durán, X., Quezada Mardones, I., Martínez Gutiérrez, M., Morales Ulloa, D., 2014, Polifenoles Totales En Pan de Abeja (*Apis Mellifera* L.) de Colmenas de La Región de La Araucanía. *Idesia (Arica)* 32(1): 107–11.
9. ATKIN, S. L., BARRIER, S., CUI, Z., FLETCHER, P. D. I., MACKENZIE, G., PANEL, V., SOL, V., ZHANG, X., 2011, UV and visible light screening by individual sporopollenin exines derived from *Lycopodium clavatum* (club moss) and *Ambrosia trifida* (giant ragweed). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 3, 102, 209–217.
10. ATTARD, E. 2013, A Rapid Microtitre Plate Folin-Ciocalteu Method for the Assessment of Polyphenols, 8(1).
11. AUDISIO, M., HORACIO, C., TERZOLO, R., APELLA, M.C., 2005, Bacteriocin from Honeybee Beebread *Enterococcus* avium, Active against *Listeria monocytogenes*, *Applied and environmental microbiology* 71(6): 3373–75.
12. FUENMAYOR, C.A., QUICAZÁN M.C., FIGUEROA, J., 2014, Evaluation of the Physicochemical and Functional Properties of Colombian Bee Pollen 19(1): 4003–14.
13. BAI, F. W., ANDERSON, W. A., MOO-YOUNG, M., 2008, Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26, 89–105.
14. BAKOUR, M., AL-WAILI, N. S., EL MENYIY, N., IMTARA, H., FIGUIRA, A. C., AL-WAILI, T., LYOUSSE, B. 2017, Antioxidant activity and protective effect of bee bread (honey and pollen) in aluminum-induced anemia, elevation of inflammatory makers and hepato-renal toxicity. *Journal of Food Science and Technology*, 13, 54, 4205–4212.
15. BALTRUSAITYTE, V., VENSKUTONIS, P. R., CEKSTERYTE, V., 2007, Antibacterial Activity of Honey and Beebread of Different Origin against *S. Aureus* and *S. Epidermidis*. *Food Technology and Biotechnology* 45(2): 201–8.
16. BALTRUSAITYTE, V., VENSKUTONIS, P.R., ČEKSTERYTE V., 2007, Radical Scavenging Activity of Different Floral Origin Honey and Beebread Phenolic Extracts, *Food Chemistry* 101(2): 502–14.
17. BARAJAS, J., CORTES-RODRIGUEZ, M., RODRÍGUEZ-SANDOVAL, E., BOGOTA, U. De,

- TADEO, J. (2012): EFFECT OF TEMPERATURE ON THE DRYING PROCESS OF BEE POLLEN FROM TWO ZONES OF COLOMBIA. *Journal of Food Process Engineering*, 2012, 35, 134–148.
18. BARENE, I., DABERTE, I., SIKSNA, S. (2014): Investigation of Bee Bread and Development of Its Dosage Forms. *Medicinos teorija ir praktika*, 1, 21, 16–22.
19. BAUM, K. A., RUBINK, W. L., COULSON, R. N., VAUGHN, M., BAUM, K. A., RUBINK, W. L., COULSON, R. N., BRYANT, V. M. (2004): Pollen Selection by Feral Honey Bee (*Hymenoptera : Apidae* ) Colonies in a Coastal Prairie Landscape. 3, 33, 727–739.
20. BELHADJ, H., HARZALLAH, D., BOUAMRA, D., KHENNOUF, S., DAHAMNA, S. (2014): Phenotypic and Genotypic Characterization of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from Bee Pollen : A Preliminary Study. *Full Paper Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 1, 33, 11–23.
21. BENZIE, I. F. F., STRAIN, J. J. (1996): The Ferric Reducing Ability of Plasma ( FRAP ) as a Measure of “ Antioxidant Power ”: The FRAP Assay. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 239, 70–76.
22. BOBIS, O., DEZMIREAN, D. S., PASCA, C. (2017): Beebread from *Apis mellifera* and *Apis dorsata* . Comparative Chemical Composition and Bioactivity. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, May, 74(1), 43–50.
23. BOGDANOV, S. (2004): Quality and Standards of Pollen and Beeswax. *APIACTA*, August, 38, 334–341.
24. BOGDANOV, S. (2017): Pollen : Production , Nutrition and Health : A Review. 1–36.
25. BOGDANOV, S., PRODUCT, B. (2016): The Bee Pollen Book Wild Thyme and Savvy set around their cell.
26. BONTA V., MARGHITAS, L. AI, STANCIU, O., LASLO, L., DEZMIREAN, D., BOBIS, O. (2008): High-Performance Liquid Chromatographic Analysis Of Sugars In Transylvanian Honeydew Honey. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 65, 229–232.
27. BONVEHI, J. S., ESCOLA, R. (1997): Nutrient Composition and Microbiological Quality of Honeybee-Collected Pollen in Spain. 96, 8561.
28. BRODSCHNEIDER, R., (2010): Review article Nutrition and health in honey bees \*. 41, 278–294.
29. BUNEA, C., POP, N., CRISTINA, A., MATEA, C., DULF, F. V, BUNEA, A. (2012): Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes ( *Vitis vinifera* ) cultivated in organic and conventional systems. *Chemistry Central Journal*, 6:66, 1–9.
30. CAMAZINE, S. (1991): Self-organizing pattern formation on the combs of honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 28, 61–76.
31. CAMPOS, M. GRAÇA; MARKHAM, K. R. 2007. *Structure Information from HPLC and On-Line Measured Absorption Spectra : Flavones , Flavonols and Phenolic Acids*.
32. CAMPOS, M. G., BOGDANOV, S., ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; SZCZESNA, T. ., MANCEBO, Y., FRIGERIO, C. ., FERREIRA, F. (2008): Pollen composition and standardization of analytical methods. *J. Apic. Res.*, January, 47, 154–161.
33. CAMPOS, M. G., WEBBY, R. F. KENNETH R. MARKHAM, 2002. The Unique Occurrence of the Flavone Aglycone Tricetin in Myrtaceae Pollen. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 57(9–10): 944–46.
34. CAMPOS, M. G., WEBBY, R. F., MARKHAM, K. R. (2002): The unique occurrence of the flavone aglycone tricetin in Myrtaceae pollen. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 9–10, 57, 944–946.
35. CAMPOS, M. G. R., BOGDANOV, S., ALMEIDA-MURADIAN, L.B. , SZCZESNA, T., MANCEBO, Y., FRIGERIO, C., FERREIRA, F.. (2015): Pollen composition and standardisation of analytical methods Pollen composition and standardisation of analytical methods . 8839.
36. CAMPOS, M. G. R., FRIGERIO, C., LOPES, J., BOGDANOV, S. (2010): What is the future of Bee-Pollen? *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 4, 2, 131–144.
37. CAMPOS, M., MARKHAM, K.R., MITCHELL, K., CUNHA, P (1997). An Approach to the Characterization of Bee Pollens via Their Flavonoid / Phenolic Profiles. *Phytochemical*

- Analysis* 8(September 1996): 181–85.
38. CAROCHO, M., FERREIRA, I. C. F. R. (2013): A review on antioxidants , prooxidants and related controversy : Natural and synthetic compounds , screening and analysis methodologies and future perspectives. 51, 15–25.
39. CARPES, SOLANGE TERESINHA, GERSON BARRETO MOURÃO SEVERINO MATIAS DE ALENCAR, M. L. M. (2009): Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. 220–229..
40. CARPES, S. T., BEGNINI, R., MATIAS DE ALENCAR, S., MASSON, M. L. (2007): STUDY OF PREPARATIONS OF BEE POLLEN EXTRACTS, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY Estudo das preparações de extratos de pólen apícola, atividade antioxidante e antibacteriana. *Ciênc. agrotec. Lavras*, 6, 31, 1818–1825.Čeksterytė, V., J. Račys, V. Kaškonienė, and P. R. Venskutonis. 2008. "Fatty Acid Composition in Beebread." *Biologija* 54(4): 253–57.
41. CEKSTERYTE, V., JANSEN, E. (2012): Composition and content of fatty acids of various floral origin beebread collected in Lithuania and prepared for storage in different. *Chemical Technology*, 2, 2, 57–61.
42. ČEKSTERYTE, V., KURTINAITIENE, B., VENSKUTONIS, P. R., PUKALSKAS, A., KAZERNAVIČIUTE, R., BALŽEKAS, J. (2016): Evaluation of antioxidant activity and flavonoid composition in differently preserved bee products. *Czech Journal of Food Sciences*, 2, 34, 133–142..
43. ČEKSTERYTĖ, V., RAČYS, J., KAŠKONIENĖ, V., VENSKUTONIS, P. R. (2008): Fatty acid composition in beebread. *Biologija*, 4, 54, 253–257.Chang, Chia-chi, Ming-hua Yang, Hwei-mei Wen, and Jjing-chuan Chern. 2002. "Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods." *Journal of Food and Drug Analysis* 10(3): 178–82.
44. CLIFFORD, M.N. BROWN, J.E. (2006). Dietary flavonoids and health – broadening the perspective in Flavonoids – Chemistry, Biochemistry and Applications (O.M.Andersen and K.R.Markham, eds), CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton,FL, 319-370
45. CHANG, C., YANG, M., WEN, H., CHERN, J. (2002): Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 3, 10, 178–182.
46. CHRISTIE, W.W., 1989, Preparation of methyl ester and other derivatives. In *Gas Chromatography and Lipids.A Practical Guide*, 1st ed.; Christie W.W., Ed.; Oily Press: Glasgow, UK, 36–44.
47. COCAN, O., MARGHITAS, L. L DEZMIREAN, D., 2009. Total Polyphenols, Flavonoids and Radical Scavenging Activity of Beepollen and Bee Bread Collected from Transylvania Area. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies* 62: 1–5.
48. CORBY-HARRIS, V., SNYDER, L., MEADOR, C., AYOTTE, T. (2018): Honey bee (*Apis mellifera*) nurses do not consume pollens based on their nutritional quality. 1–21.
49. CUSHNIE, T. P. T., LAMB, A. J. (2005): Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343–356. .
50. DEZMIREAN,D., MĂRGHITAȘ, L., CHIRILĂ, F., COPACIU, F., SIMONCA, V., Bobis O. Erler, S. (2017): Influence of geographic origin , plant source and polyphenolic substances on antimicrobial properties of propolis against human and honey bee pathogens. *Journal of Apicultural Research*, 5, 56, 588–597.
51. DE-MELO, A. A. M., ESTEVINHO, L. M., MOREIRA, M. M., ALEX, C. D., BARTH, O. M., ALMEIDA-MURADIAN, L. B. (2018): Phenolic profile by HPLC-MS , biological potential, and nutritional value of a promising food : Monofloral bee pollen. February, 1–21.
52. DEGRANDI-HOFFMAN, G., ECKHOLM, B., HUANG, M. (2015): Methods for Comparing Nutrients in Beebread Made by Africanized and European Honey Bees and the Effects on Hemolymph Protein Titers. *Journal of Visualized Experiments*, 97, 1–8.
53. ELANGO, R., BALL, Æ. R. O., PENCHARZ, Æ. P. B. (2009): Amino acid requirements in

- humans : with a special emphasis on the metabolic availability of amino acids. *Amino Acids*, 37, 19–27.
54. EREL, O. (2004): A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 4, 37, 277–285.
55. ERLER, S., MORITZ, R. F. A. (2016): Pharmacophagy and pharmacophory: mechanisms of self-medication and disease prevention in the honeybee colony (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 3, 47, 389–411.
56. ESTEVINHO, L. M., RODRIGUES, S., PEREIRA, A. P. (2012): Original article Portuguese bee pollen : palynological study , nutritional and microbiological evaluation. *international Journal of Food Science and Technology*, 47, 429–435.
57. ESTEVINHO, L., PEREIRA, A. P., MOREIRA, L., DIAS, L. G., PEREIRA, E. (2008): Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, 12, 46, 3774–3779.
58. FEAS, X., VAZQUEZ-TATO, M. P., ESTEVINHO, L., SEIJAS, J. A., IGLESIAS, A. (2012): Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*, 7, 17, 8359–8377.
59. FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, H.S., 1951, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissue, *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497–509.
60. FRANCISCO TOMAS-LORENTE, GARCIA-GRAU M., J.L. NIETO FRANCISCO A. TOMAS-BARBERA. 1992. "Flavonoids From." 31(6): 2027–29.
61. FUENMAYOR, C. A., FIGUEROA, M. C. Q. J. F. (2011): EMPLEANDO BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PROBIÓTICAS. *Alimentos Hoy*, 23, 20, 17–39.
62. GHELOF, N., WANG, X. H., ENGESETH, N. J. (2002): Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21, 50, 5870–5877.
63. GOULD, K.S. AND LISTER, C. (2006). Flavonoid functions in plants. In," *Flavonoids – Chemistry, Biochemistry and Applications*" (O. M. Andersen and K.R. Markham, eds), CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton FL, 397–442.
64. GILLIAM, M., PREST, D. B., LORENZ, B. J. (1989): Microbiology of pollen and bee bread : taxonomy and enzymology of molds. *Apidologie*, 1, 20, 53–68.
65. GILLIAM, M. (1979): Microbiology of Pollen and Bee Bread : the Genus *Bacillus*. *Apidologie*, 3, 10, 269–274.
66. GIUSEPPINA NEGRI, CARELLI BARRETO L.R., LUGLI SPER, f., CLAUDEMIR DE CARVALHO, CAMPOS, M. da G. R. (2018): Phytochemical analysis and botanical origin of *Apis mellifera* bee pollen from the municipality of Canavieiras , Bahia State , Brazil *Análise fitoquímica e origem botânica de uma amostra de pólen apícola*. *J. Food Technol.*
67. GRAIKOU, K., KAPETA, S., ALIGIANNIS, N., SOTIROUDIS, G., CHONDROGIANNI, N. (2011): Chemical analysis of Greek pollen - Antioxidant , antimicrobial and proteasome activation properties. *Chemistry Central Journal*, 5:33, 7–9.
68. HABRYKA, C., KRUCZEK, M., & DRYGAS, B. (2016): Bee products used in apitherapy. *World Scientific News*, June, 48, 254–258.
69. HERBERT, E.W., 1997, Chapter 6. Honey bee nutrition. In: *The hive and the honey bee*. Edited J.M. Graham. Dadant & Sons, Hanilton, Illinois, USA.
70. HRYNIEWICKA, M., 2016. "LC/MS/MS Analysis of  $\alpha$ -Tocopherol and Coenzyme Q10 Content in Lyophilized Royal Jelly, Beebread and Drone Homogenate." *Journal of Mass Spectrometry* 51(11): 1023–29.
71. HUMAN, H., NICOLSON, S. W. (2006): Nutritional content of fresh , bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var . *davyana* ( *Asphodelaceae* ). *Phytochemistry*, 67, 1486–1492.
72. IHC, 1997, *Apidologie*, 28: 6.
73. ISIDOROV, V. A., ISIDOROVA, A. G., SCZCZEPANIAK, L., CZYZEWSKA, U. (2009): Gas



- chromatographic-mass spectrometric investigation of the chemical composition of beebread. *Food Chemistry*, 3, 115, 1056–1063.
74. IVANIŠOVÁ, E., KAČÁNIOVÁ, M., FRANČÁKOVÁ, H., PETROVÁ, J., HUTKOVÁ, J., BROVARSKÝI, V., VELYCHKO, S., ADAMCHUK, L., SCHUBERTOVÁ, Z., MUSILOVÁ, J. (2015): Bee bread - Perspective source of bioactive compounds for future. *Potravinarstvo*, 1, 9, 592–598
75. JACK, R. W., TAGG, J. R., EV, M. I. R. (1995): Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*, 2, 59, 171–200.
76. JIN, T., SARAVANAKUMAR, K., WANG, M. (2017): Biocatalysis and Agricultural Biotechnology In vitro and in vivo antioxidant properties of water and methanol extracts of linden bee pollen. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, November 2017, 13, 186–189.
77. JOHN, R. P., NAMPOOTHIRI, K MADHAVAN, A. P. (2007): Fermentative production of lactic acid from biomass : an overview on process developments and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74, 524–534.
78. JR, E. W. H., SHIMANUKI, H. (1978): CHEMICAL COMPOSITION AND NUTRITIVE VALUE OF BEE-COLLECTED AND BEE-STORED POLLEN To cite this version: HAL Id : hal-00890453. *Apidologie*, 1, 9, 33–40.
79. KAPLAN, M., KARAOGLU, Ö., EROGLU, N., SILICI, S. (2016): Fatty acid and proximate composition of bee bread. *Food Technology and Biotechnology*, 4, 54, 497–504.
80. KAŠKONIEŇ, V., KATILEVIČIŮTĚ, A., KAŠKONAS, P., MARUŠKA, A. (2018): The impact of solid-state fermentation on bee pollen phenolic compounds and radical scavenging capacity. *Chemical Papers*, 0123456789, 1–6.
81. KATARÍNA FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, JANKA NŮŽKOVÁ, MIROSLAVA KAČÁNIOVÁ , MAGDA MÁRIÁSSYOVÁ, K. R. & M. S. (2013): Journal of Environmental Science and Health , Part B : bee pollen Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *Journal of Environmental Science and Health Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, March, 48:2, 133–138.
82. KIELISZEK, M., PIWOWAREK, K., KOT, A. M., BŁĄŻEJAK, S., CHLEBOWSKA-ŚMIGIEL, A., WOLSKA, I. (2018): Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, March 2017, 71, 170–180.
83. KRELL, R. 1996. Fao Agriculture Services Bulletin *VALUE-ADDED PRODUCTS FROM BEEKEEPING*
84. KRISHNA, C., 2005. Solid-State Fermentation Systems — An Overview Solid-State Fermentation Systems — An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology* 25(1–2): 1–30.
85. KROYER, G. U., HEGEDUS, N. (2001): Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2, 171–174.
86. LEJA M, MARECZEK A, WYŻGOLIK G, KLEPACZ-BANIAK J, C. K. (2007): Food Chemistry Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *FOOD CHEMISTRY*, 100, 237–240.
87. LOUVEAUX, J., MAURIZIO, A., VORWOHL, G. (1978): Methods of Melissopalynology. *Bee world*, 59, 139–158.
88. LUJERDEAN, A., VARGA, A., 2002, Metode și tehnici de laborator în biochimie, *Ed. AcademicPress*, Cluj-Napoca.
89. MANNING, R. (2015): Fatty acids in pollen : a review of their importance for honey bees Fatty acids in pollen : a review of their importance for honey. *Bee world*, 82:2, 60–75.
90. MANNING, R. 2015. Fatty Acids in Pollen : A Review of Their Importance for Honey Bees Fatty Acids in Pollen : A Review of Their Importance for Honey. *Bee world* 82:2,60–75.
91. MĂRGĂOAN, R., MĂRGHITAȘ, L. AI, DEZMIREAN, D. S., DULF, F. V., BUNEA, A., SOCACI, S. A., BOBIȘ, O. (2014): Predominant and secondary pollen botanical origins influence the carotenoid and fatty acid profile in fresh honeybee-collected pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 62, 6306–6316.

92. MĂRGHITAȘ, L.A., 2015, Albinele și produsele lor, Editura Ceres, București
93. MĂRGHITAȘ, L. A., STANCIU, O. G., DEZMIREAN, D. S., BOBIȘ, O., POPESCU, O., BOGDANOV, S., CAMPOS, M. G. (2009): In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. Food Chemistry, 3, 115, 878–883.
94. MARKHAM, K.R, CAMPOS M.G.R 1996.7- And 8-O-Methylherbacetin-3-O-Sophorosides From Bee Pollens And Some Structure / Activity Observations.43(4): 763–67.
95. Markiewicz-Zukowska, Renata et al. 2013. "Chemical Composition and Antioxidant Activity of Beebread, and Its Influence on the Glioblastoma Cell Line (U87MG)." *Journal of Apicultural Science* 57(2): 147–57.
96. MARKIEWICZ-ZUKOWSKA, R., NALIWAJKO, S. K., BARTOSIUK, E., MOSKWA, J., ISIDOROV, V., SOROCZYŃSKA, J., BORAWSKA, M. H. (2013): Chemical composition and antioxidant activity of beebread, and its influence on the glioblastoma cell line (U87MG). *Journal of Apicultural Science*, 2, 57, 147–157.
97. MERRILL, A. BERNICE L., WATT, L. 1955. *Energy value of food basis and derivations* United Sta(Agriculture Handbook, 74).
98. MIROSLAVA K., VUKOVIĆ, N. CHLEBO R., HAŠČÍK, P., ROVNÁ, K., DŽUGAN, M., PASTERNAKIEWICZ, A., CUBON, J. (2012). "Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture in Nitra, 949 76." *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 64(3): 927–34.
99. MARKOWICZ BASTOS, D. H., MONIKA BARTH, O., ROCHA, I., DA SILVA CUNHA, C., DE OLIVEIRA CARVALHO, I. B., TORRES, P., MICHELAN, M. (2004): Fatty acid composition and palynological analysis of bee (apis) pollen loads in the states of são paulo and minas gerais, Brazil. *Journal of Apicultural Research*, 2, 43, 35–39.
100. MOLYNEUX, P., (2004). The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl- Hydrazyl ( DPPH ) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26: 211–19.
101. MORAIS, M., MOREIRA, L., FEÁS, X., ESTEVINHO, L. M. (2011): Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks : Palynological origin , phenolic content , antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 5, 49, 1096–1101..
102. NAGAI, T., NAGASHIMA, T., MYODA, T., INOUE, R. (2004): Preparation and functional properties of extracts from bee bread. *Nahrung - Food*, 3, 48, 226–229.
103. NAGAI, T., NAGASHIMA, T., SUZUKI, N., INOUE, R. (2005): Antioxidant activity and angiotensin I-converting enzyme inhibition by enzymatic hydrolysates from bee bread. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 1–2, 60, 133–138
104. NIJVELDT, R. J., ELS VAN NOOD, DANNY EC VAN HOORN, PETRA G BOELEN, KLASKE VAN NORREN, and P. A. van L. (2001): Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and. 418–425.
105. NICOLSON, S. W., NICOLSON, S. W. (2011): Bee Food : The Chemistry and Nutritional Value of Nectar , Pollen and Mixtures of the Two Bee food : the chemistry and nutritional value of nectar , pollen and mixtures of the two. 2, 46, 197–204.
106. OLOFSSON, T. C., ALSTERFJORD, M., NILSON, BO, BUTLER , EILE, V. A. (2014): *Lactobacillus apinorum* sp . nov ., *Lactobacillus mellifer* sp . nov ., *Lactobacillus mellis* sp . nov ., *Lactobacillus melliventris* sp . nov ., *Lactobacillus kimbladii* sp . nov ., *Lactobacillus helsingborgensis* sp . nov . and *Lactobacillus kullabergensis* sp . international journal of systematic and Evolutionary Microbiology, 64, 3109–3119.
107. PASCOAL, A., RODRIGUES, S., TEIXEIRA, A., FEÁS, X., ESTEVINHO, L. M. (2014): Biological activities of commercial bee pollens : Antimicrobial , antimutagenic , antioxidant and anti-inflammatory. *FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY*, 63, 233–239.
108. PEDRO GUILHERME FERNANDES-DA-SILVAA, J. E. Serrão. (2000): Original article Nutritive value and apparent digestibility of bee-collected and bee-stored pollen in the stingless bee , *Scaptotrigona postica* Latr . *Apidologie*, 31, 39–45.
109. POPESCU, N., MEICA, S., 1997, Produsele apicole si analiza lor chimica, Ed. Diacon Coresi,

- București.
110. PUGLIESE, A. G., TOMAS-BARBERAN, F. A., TRUCHADO, P., GENOVESE, M. I., PRESTES, L. (2013): Flavonoids, Proanthocyanidins, Vitamin C, and Antioxidant Activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) Pulp and Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 2720–2728.
  111. RE, R., PELLEGRINI N., PROTEGGENTGE, A., PANNALA A., YANG, M., RICE-EVANS, C. (1999): Antioxidant Activity Applying An Improved Abts Radical. *Free Radical Biology Medicine*, 98, 26, 1231–1237.
  112. ROULSTON, T. H. I., CANE, J. H. (2000): Plant Systematics Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution*, 222, 187–209.
  113. SABATIER, S., M.J. AMIOT, M. TACCHINI, (1992): of Flavonoids in Sunflower. *Bull. de Liaison du Groupe Polyphenol*, 3, 14, 330–331.
  114. SAKANAKA, S., ISHIHARA, Y. (2008): Food Chemistry Comparison of antioxidant properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radical-scavenging assays. *Food Chem.* 107, 107, 739–744.
  115. SALAZAR-GONZÁLEZ, C., DÍAZ-MORENO, C. (2016): Aptitud nutricional y bioactiva del polen de abeja para un proceso de fermentación en estado sólido. *Journal of Apicultural Research*, 2, 55, 161–175.
  116. SATI, P., PANDEY, A., RAWAT, S., RANI, A. (2013): Phytochemicals and antioxidants in leaf extracts of *Ginkgo biloba* with reference to location , seasonal variation and solvent system. *JOPR: Journal of Pharmacy Research*, 9, 7, 804–809.
  117. SILVA, F. A. M., BORGES, F., GUIMARA, C. (2000): Phenolic Acids and Derivatives : Studies on the Relationship among Structure , Radical Scavenging Activity , and Physicochemical Parameters †. *Figure 1*, 2122–2126.
  118. SOBRAL, F., CALHELHA, R. C., BARROS, L., DUEÑAS, M., TOMÁS, A., SANTOS-BUELGA, C., VILAS-BOAS, M., FERREIRA, I. C. F. R. (2017): Flavonoid composition and antitumor activity of bee bread collected in Northeast Portugal. *Molecules*, 2, 22, 1–12.
  119. SOCACIU C., 2000, *Chimie fizică și coloidală, Ed. AcademicPres*, Cluj-Napoca
  120. SR 784-3:2009. Standard Român. Miere de albine. Partea 3:Metode de analiză.
  121. STANCIU, O., DEZMIREAN, D., MARGHITAS, L., 2007. Examination Of Antioxidant Capacity Of Beebread Extracts By Different Complementary Assays. 63–64.
  122. STANCIU, O., DEZMIREAN, D., CAMPOS M.G. (2016): Bee Pollen in Transylvania (Romania): Palynological Characterization and ORACFL Values of Lipophilic and Hydrophilic Extracts of Monofloral Pollen Pellets. *Journal of Agricultural Science and Technology A*, 1, 6, 18–37.
  123. STANCIU, O.G., MARGHITAS, L., DEZMIREAN, D.. (2009). Macro- and Oligo-Mineral Elements from Honeybee-Collected Pollen and Beebread Harvested from Transylvania (Romania). *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies* 66: 276–81.
  124. SZCZESNA, T. (2006a.) Long-Chain Fatty Acids Composition Of Honeybee-Collected Pollen." *Journal of Apicultural Science* 50(2): 65–80.
  125. SZCZESNA, T. (2006b.) Protein Content And Amino Acids Compositon Of Bee-Collected Pollen Originating From Poland , South Korea And China, *Journal of Apicultural Science* 50(2): 91–99.
  126. SZCZESNA, T., (2007c), Study On The Sugar Composition Of Honeybee-Collected Pollen. *Journal of Apicultural Science* 51(1): 15–22.
  127. TARNAVSCHI, I.T., SERBANESCU-JITARIU, G., MITROIU-RADULESCU, N., RADULESCU, D., 1981, Morfologia polenului florei din Romania, Volumul I, *Editura Academiei Republicii Socialiste Romania*, București.
  128. TARNAVSCHI, I.T., SERBANESCU-JITARIU, G., MITROIU-RADULESCU, N., RADULESCU, D., 1987, Morfologia polenului florei din Romania, Volumul II, *Editura Academiei Republicii Socialiste Romania*, București.
  129. TARNAVSCHI, I.T., SERBANESCU-JITARIU, G., MITROIU-RADULESCU, N., RADULESCU, D., 1990, Morfologia polenului florei din Romania, Volumul III, *Editura Academiei Republicii*

*Socialiste Romania, București.*

130. TAVDIDISHVILI, D., KHUTSIDZE, T., PKHAKADZE, M., VANIDZE, M., KALANDIA, A. (2014): Flavonoids in Georgian bee bread and bee pollen. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 8, 676–681.
131. TAYLOR, P., KELLER, I., FLURI, P., IMDORF, A., KELLER, I., FLURI, P., IMDORF, A. (2005): Original article development in honey bees : part I. *Bee world*, July, 86(1), 37–41.
132. THAIPONG, K., BOONPRAKOB, U., CROSBY, K., CISNEROS-ZEVALLOS, L., HAWKINS, D., (2006). "ARTICLE IN PRESS Comparison of ABTS , DPPH , FRAP , and ORAC Assays for Estimating Antioxidant Activity from Guava Fruit Extracts." *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 669–75.
133. TLILI, N., MEJRI, H., YAHIA, Y., SAADAOU, E., REJEB, S., KHALDI, A. (2014): Phytochemicals and antioxidant activities of *Rhus tripartita* ( Ucria ) fruits depending on locality and different stages of maturity. *FOOD CHEMISTRY*, 160, 98–103.
134. TOMAS-BARBERAN, F. A., TOMAS-LORENTE, F., FERRERES, F., GARCIA-VIGUERA, C. (1988): Flavonoids as Biochemical Markers of the Plant Origin of Bee Pollen. *Harborne* 1967, 50, 337–340.
135. TOMÁS, A., FALCÃO, S. I., RUSSO-ALMEIDA, P., VILAS-BOAS, M. (2017): Potentialities of beebread as a food supplement and source of nutraceuticals: Botanical origin, nutritional composition and antioxidant activity. *Journal of Apicultural Research*, 3, 56, 219–230.
136. URCAN, A., MĂRGHITAȘ, L. A., DEZMIREAN, D. S., BOBIȘ, O., BONTA, V., MUREȘAN, C. I., MĂRGĂOAN, R. (2017): Chemical Composition and Biological Activities of Beebread – Review. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies*, 74(1), 6–14.
137. VAMANU, A., VAMANU, E., DRUGULESCU, M., POPA, O., CIMPEANU G., (2006.) Identification of a Lactic Bacterium Strain Used for Obtaining a Pollen-Based Probiotic Product. *Turkish Journal of Biology* 30(2): 75–80.
138. VÁSQUEZ, A., OLOFSSON, T. C. (2009): The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research*, 3, 48, 189–195.
139. VEZETEU, T. V., BOBIȘ, O., MORITZ, R. F. A., BUTTSTEDT, A. (2017): Food to some, poison to others - honeybee royal jelly and its growth inhibiting effect on European Foulbrood bacteria. *MicrobiologyOpen*, 1, 6, 3–9.
140. WANG, R., SU, G., WANG, L., XIA, Q., LIU, R., LU, Q. (2018): Identification and mechanism of effective components from rape ( *Brassica napus* L. ) bee pollen on serum uric acid level and xanthine oxidase activity. *Journal of Functional Foods*, January, 47, 241–251.
141. WU, G. (2009): Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids*, 37, 1–17.
142. XU, X., SUN, L., DONG, J., ZHANG, H. (2009): Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil with supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 10, 42–46.
143. YANG, K., WU, D., YE, X., LIU, D., CHEN, J., SUN, P. (2012): Characterization of Chemical Composition of Bee Pollen in China Characterization of Chemical Composition of Bee Pollen in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3, 61, 708–718.
144. ZULUAGA, C. M., SERRATO, J. C., QUICAZAN, M. C. (2015): Chemical, nutritional and bioactive characterization of Colombian bee-bread. *Chemical Engineering Transactions*, 43, 175–180.
145. ZULUAGA, D., MARIO, C., SERRATO, B., CARLOS, J., C. Q. De, CECILIA, M. (2014): Valorization Alternatives Of Colombian Bee-Pollen For Its Use As Food Resource – A Structured Review. *VITAE*.
146. [www.geo.arizona.edu/palynology](http://www.geo.arizona.edu/palynology)
147. [www.pollen.tstebler.ch/MediaWiki](http://www.pollen.tstebler.ch/MediaWiki)
148. [www.saps.plantsci.cam.ac.uk/pollen/index.htm](http://www.saps.plantsci.cam.ac.uk/pollen/index.htm)
149. <https://ro.wiktionary.org/wiki/pollen>

---

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

# Evaluarea potențialului bioactiv al păsturii

---

Doctorand **Adriana Cristina Urcan**

---

Conducător de doctorat **Prof. univ. dr. ing. Liviu  
Alexandru Mărghițaș**

---



## **INTRODUCERE**

Produsele apicole au fost utilizate de secole atât în dieta umană, cât și în medicina tradițională, datorită proprietăților nutriționale și fiziologice și pentru efectele lor benefice asupra organismului uman (KROYER și HEGEDUS, 2001).

Pentru obținerea păsturii în mod natural albinele preseză polenul colectat, în celulele fagurilor, la care mai adaugă salivă, nectar și miere (BOGDANOV, 2016). Amestecul de polen sub influența temperaturii, a enzimelor și a microbiotei naturale din polen se transformă în păstură și reprezintă principala sursă proteică pentru stup (BRODSCHNEIDER, 2010).

Studiile anterioare au arătat că păstura are o biodisponibilitate mai ridicată decât polenul și este mai ușor de digerat de către organismul uman reprezentând o sursă naturală de proteine și aminoacizi, motiv pentru care a câștigat din ce în ce mai multă popularitate printre consumatori în ultima perioadă.

Metodele de extracție ale păsturii din fagure sunt unele extrem de invazive, implicând distrugerea fagurelui, iar randament de extracție este unul foarte mic, motiv pentru care biotehnologiile în continua dezvoltare au căutat metode alternative pentru obținerea acestui produs.

De asemenea este extrem de importantă cunoașterea în detaliu a potențialului păsturii naturale și propunerea unui standard de calitate pentru acest produs pentru a putea crea produse tip păstură cu caracteristici similare sau chiar superioare.

Astfel cercetarea științifică întreprinsă în cadrul acestei lucrări a avut ca și motivație necesitatea obținerii și caracterizării unui produs cu potențial bioactiv pe bază de polen care să reprezinte o legătură între sănătatea umană, biotehnologiile alimentare și cercetarea aplicată și care să ajute la acceptarea de către consumator a unui astfel de produs.

În acest context, lucrarea de față dorește să aducă o contribuție importantă în ceea ce privește studiul păsturi și al unui produs tip păstură, din punct de vedere al compoziției chimice și al compușilor biologic activi cu proprietăți antioxidante și antimicrobiene.

## **SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI**

Cercetările realizate în cadrul tezei de doctorat „Evaluarea potențialului bioactiv al păsturii” au avut ca și principal scop elaborarea unui produs funcțional de tip păstură, cu caracteristici similare celui natural, prin valorificarea potențialului fermentescibil al polenului de albine și evidențierea principiilor nutritive și proprietățile biologice ale acestuia înainte și după procesul fermentativ.

## Obiectivele generale

Studiile existente în literatura de specialitate care demonstrează proprietățile nutritive și bioactive ale păsturii sunt extrem de puține, motiv pentru care în cadrul acestei teze s-au abordat două direcții de cercetare pentru realizarea scopului stabilit.

Pentru obținerea unui produs tip păstură, cu caracteristici similare celui natural, este necesară, în primul rând, cunoașterea valorii nutritive și a potențialului biologic al păsturii naturale, iar datorită absenței unui standard de calitate pentru acest produs s-a desprins prima direcție de cercetare din cadrul aceste teze care a fost reprezentată de caracterizarea păsturii naturale, prin:

- Cuantificarea compușilor care îi dau valoarea nutritivă;
- Corelarea originii botanice a păsturii cu profilul compușilor biologic activi;
- Studierea potențialului bioactiv al păsturii, prin determinarea capacității antioxidante și antimicrobiene.

A doua direcție de cercetare a fost reprezentată de exploatarea polenului apicol ca și substrat fermentescibil, pentru fermentația solidă, în vederea obținerii unui produs functional tip păstură. Pentru realizarea scopului s-au stabilit următoarele obiective specifice:

- Stabilirea unui protocol de lucru pentru obținerea unui produs tip păstură;
- Studierea efectului fermentației asupra nutrienților din polen;
- Cuantificarea compușilor biologic activi din polen înainte și după fermentație și corelarea acestora cu originea botanică a polenului;
- Studierea proprietăților biologice ale polenului prin comparație, înainte și după procesul de fermentație.

## STRUCTURA TEZEI

Teza de doctorat „Evaluarea potențialului bioactiv al păsturii” este structurată în două părți principale. În prima parte, Capitolele 1 și 2, este prezentat stadiul actual al cunoașterii în conformitate obiectivele propuse, tratându-se aspecte legate de păstura produsă de albine și de cea obținută artificial cu accent pe compoziția chimică, compușii biologic activi din clasa polifenolilor și activitatea antioxidantă și antimicrobiană. Partea a doua (Capitolele 3-6) cuprinde contribuția personală, rezultate, discuții, concluzii și perspective de viitor pentru cercetare în ceea ce privește păstura și polenul fermentat. Numărul total al tabelelor din această teză de doctorat este de 34, iar numărul total al figurilor este de 59.

Prima parte, **STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII** privind păstura și polenul fermentat, este structurată în două capitole.

**Capitolul 1** cuprinde trei subcapitole în care sunt prezentate, în urma sintetizării datelor din literatura de specialitate, noțiuni generale despre păstură, compoziția chimică, compuși biologic activi și proprietăți terapeutice ale acesteia.

**Capitolul 2** cuprinde stadiul actual al cunoașterii în ceea ce privește obținerea păsturii în condiții de laborator. Din studiul de literatură realizat reiese că polenul de albine este un excelent substrat pentru fermentație, bogat în glucide simple, proteine și lipide, dar care din păcate nu este valorificat la adevăratul său potențial. Literatura de specialitate fiind extrem de săracă în informații referitoare la caracterizarea polenului fermentat.

Partea a doua, constă în **CONTRIBUȚIA PERSONALĂ** și este structurată în patru capitole ce însumează două studii concludente.

**Capitolul 3 MATERIALE ȘI METODICĂ.** Sunt descrise pe parcursul a cinci subcapitole, materialul biologic și metodele experimentale utilizate pe parcursul cercetărilor din cadrul tezei de doctorat pentru caracterizarea păsturii și a polenului fermentat.

**Capitolele 4 și 5 REZULTATE ȘI DISCUȚII.** Fiecare capitol este alcătuit din cinci subcapitole, în care sunt prezentate rezultatele obținute privind valoarea nutritivă și activitățile biologice ale păsturii (Capitolul 5) și ale polenului fermentat (Capitolul 6), precum și interpretarea statistică a datelor obținute în cadrul acestor cercetări.

**Capitolul 6 CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI.** Cuprinde concluziile și recomandările care s-au desprins în urma cercetărilor efectuate în cadrul tezei de doctorat, iar în final sunt enunțate elementele de originalitate ale tezei și perspectivele de viitor.

## **CONTRIBUȚIA PERSONALĂ**

### **Capitolul 3. MATERIALE ȘI METODICĂ**

#### **3.1. MATERIALUL BIOLOGIC**

Materialul biologic utilizat în vederea efectuării experimentelor este format din probe de pătură și polen obținute direct de la apicultori sau din comerț. Până în momentul analizării porbele de păstură a fost păstrate în congelator la temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  pentru a se preveni degradarea lor.

Cercetările realizate în cadrul aceste lucrări au fost efectuate în Laboratorul de Controlul Calității Produselor Apicole (APHIS) din cadrul Institutului de Științele Vieții al USAMV Cluj-Napoca, în cadrul Departamentului de Biochimie al USAMV Cluj-Napoca și la Facultatea de Farmacie de la Universitatea Coimbra (Universidade de Coimbra), Portugalia.

### **CAPITOLUL 4. REZULTATE ȘI DISCUȚII**

#### **REZULTATE ȘI DISCUȚII PRIVIND PĂSTURA**

În acest capitol sunt prezentate rezultatele cercetărilor obținute pentru păstura naturală. În urma analizei statistice s-a remarcat faptul că între probele de păstura analizate au existat diferențe semnificative din punct de vedere statistic ( $p < 0,05$ ), aceste variații fiind influențate în mod direct de originea botanică a probelor analizate.

Conform analizei palinologice, toate probele analizate au fost clasificate ca fiind poliflore având în compoziție tipuri și procente diferite de polen, cu excepția probelor P5 și P8 care au fost monoflore,  $>95\%$  polen de *Brassica napus* (rapiță).



### **Rezultate și discuții privind valoarea nutritivă a păsturii**

Carbhidrații totali au fost calculați prin diferență, după determinarea cenușii, a proteinelor și a lipidelor (CAMPOS și colab., 2008). Pe baza rezultatelor obținute, se estimează că valoarea energetică asociată cu consumul de păstură este în medie de 451.22 kcal/100 g.

Valoarea medie a pH-ului păsturii analizate a fost de 4.02, iar aciditatea a avut o medie de 4.70 meq/kg. Valoarea scăzută a pH-ului ajută la o mai bună conservabilitate a produsului, motiv pentru care păstura este mai puțin perisabilă decât polenul.

### **Rezultate și discuții privind conținutul de compuși biologic activi**

Un număr de 28 de aminoacizi liberi au fost identificați și cuantificați prin metoda LC-MS, din probele de păstură. În probele analizate au fost identificați noua aminoacizi esențiali (treonina, metionina, lisina, histidina, valina, triptofanul, leucina, fenilalanina și isoleucină). Proba P1 (*Rosaceae, Salicaceae, Fagaceae*) a fost caracterizată prin cantitatea cea mai mare de aminoacizi, 5385.97 mg/100g, în timp ce pentru proba P12 (*Salicaceae, Fabaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Lamiaceae*) s-a înregistrat cea mai mică valoare a aminoacizilor totali, 697.87 mg/100g. O astfel de variație a conținutului în aminoacizi este influențată de originea florală, factorii biologici, ecologici și geografici din timpul producției, precum și de manipularea și condițiile de depozitare a păsturii.

În extractele lipidice analizate au fost identificați, prin metoda GS-MS, 12 acizi grași. Acidul  $\alpha$  - linolenic, a fost identificat în cea mai mare cantitate și a avut valori cuprinse între 18.11% în P7 (*Fabaceae, Tiliaceae, Asteraceae, Plantaginaceae*) și 82.77% în P4 (*Brassicaceae, Asteraceae, Rosaceae, Salicaceae, Fagaceae, Apiaceae*), urmat de acidul palmitic cu valori care au variat între 10.48 în P1 (*Rosaceae, Salicaceae, Fagaceae*) și 46.66 în P7 (*Fabaceae, Tiliaceae, Asteraceae, Plantaginaceae*) și de acidul linoleic cu valori cuprinse între 1.29 în P5 (*Brassicaceae*) și 32.46 în P10 (*Myrtaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae, Gramineae*). Acidul capric, acidul lauric, acidul miristic, acidul stearic, acidul oleic, acidul elaidic, acidul arahidic, acidul behenic și acidul erucic au fost identificate în cantități mai mici (<3%).

Cantitatea de polifenoli din extractele de păstură românească au fost cuprinse între 6.31 mg GAE/g în P14 (*Boraginaceae, Fabaceae, Brassicaceae, Plantaginaceae, Lamiaceae*) și 16.12 mg GAE /g în P17(*Brassicaceae, Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Salicaceae*), iar în cazul extractelor etanolice de păstură indiană valorile au fost similar 5.67 mg GAE/g în P9 (*Myrtaceae*) și 15.34 mg GAE/g în P10 (*Myrtaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae, Gramineae*).

Valorile flavonoidelor totale au fost cuprinse între 0,22 mg Qe/g păstură în proba P2 (*Fabaceae, Asteraceae, Lamiaceae*) și 13.39 mg Qe/g păstură în prboa P9 (*Myrtaceae- Eucalyptus sp.*), cu o medie de 4.16 mg Qe/g păstură. Conținutul de flavonoide totale obținut pentru proba de păstură românească, identificată ca având polen predominant de *Brassica sp.* (97%), a fost de 5.01 mg QE/g, iar pentru proba de păstură echivalentă, din India de 5.02 mg QE/g. Cea mai mare cantitate de flavonoide,

de 13.39 mg Qe/g păstură, a fost identificată în proba P9, această având polenul predominant de *Eucalyptus* sp.

În această lucrare s-a încercat pentru prima dată identificarea originii botanice a păsturii cu ajutorul amprenteii polifenolice lucru realizat anterior doar pentru polenul de albine. Tehnica HPLC/DAD s-a dovedit a fi convenabilă pentru identificarea originii botanice a probelor analizate și utilă în caracterizarea constituenților predominanți ai acestuia. În cazul probelor monoflore aceste cromatograme au fost suficiente pentru a distinge specie de polen, după ce a fost comparat cu referințele din baza de date existentă. Astfel, flavonoidele, deja recunoscute ca și markeri biochimici ai plantelor în general (TOMAS-BARBERAN și colab., 1988), sunt utilizate aici ca și markeri ai speciilor florale care corespund probelor studiate.

Toate flavonoidele identificate în probele de păstură sunt flavone sau derivate ale flavonelor. Aceste flavonoide atunci când sunt legate de glucide apar sub formă de *O*-glicozide. În ceea ce privește polifenolii identificați aceștia sunt predominant derivați ai acidului hidroxicinamic.

Profilul HPLC/DAD obținut pentru păstura din România și din India, ambele având în componență polen de *Brassica* sp ca și principal taxon (< 97%) au fost identice. Spectrele UV ale compușilor 1 și 2 corespund flavonolilor glicozidați la carbonul C<sub>3</sub> și sunt ambii derivați ai 3-*O*-kamferol. Toți ceilalți compuși sunt derivați ai acidului hidroxicinamic (date în conformitate cu CAMPOS ȘI MARKHAM, 2007) cu o probabilitate mare de structuri polimerizate cum ar fi poliamide de spermidină.

Pe lângă probele de păstură cu polen majoritar de rapiță, a fost analizat și polen provenit direct de la plante de rapiță pentru a demonstra, prin comparații ale profilului cromatografic al polenului vegetal natural, al polenului de albine și a păsturii, dacă saliva albinelor și fermentarea polenului afectează în vreun fel compoziția flavonoidelor prin acțiunea enzimatică. Din datele obținute, profilul a fost menținut în toate probele analizate.

În proba de păstură care a avut în componență polenul de *Eucalyptus* sp. au fost identificate flavonoidele caracteristice acestei specii florale: doi flavonoli quercetina 3-*O* soforozidă (compusul 1) și myricitina (compusul 4) și două flavone, tricetina (compusul 5) și luteolina (compusul 6). Tricetina este un biomarker pentru *Myrtaceae* (CAMPOS și colab., 2002).

În contrast cu profilele HPLC/DAD identificate pentru probele monoflore care au în componență un polen predominant dintr-o anumită specie, în cazul probelor poliflore, a fost extrem de dificilă găsirea unei corespondențe corecte între profilul obținut (extrem de complex) și proveniența botanică a polenului.

În cadrul acestei lucrări s-a raportat pentru prima dată că acest profil fenolic rămâne neschimbat în cazul polenului floral (colectat manual), al polenului de albine și al păsturii. În ciuda transformărilor biochimice care apar în timpul fermentației păsturii, se pare că acești compuși fenolici nu sunt afectați și rămân neschimbați. De asemenea, variabile precum solul, clima nu par să influențeze acești compuși în cazul probelor studiate.

Activitatea antioxidantă a probelor de păstură a fost testată prin trei metode complementare: DPPH, TEAC și FRAP. Abordarea complementară a acestei analize s-a realizat în ideea comparării și corelării rezultatelor obținute.

Capacitatea de caprare a radicalului liber DPPH a probelor testate a înregistrat valori cuprinse între 0.402 mmoli Trolox/g păstură (P2 - *Fabaceae*, *Asteraceae* și *Lamiaceae*) și 1.966 mmoli Trolox/g păstură (P17- *Brassicaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae* și *Salicaceae*).

În ceea ce privește captarea radicalului ABTS, probele de păstură au demonstrat o variabilitate foarte mare a capacității antioxidante. Valorile obținute au fost situate în intervalul 0.891 mmoli Trolox/g (P14 - *Boraginaceae*, *Fabaceae*, *Brassicaceae*, *Plantaginaceae*, *Fabaceae*) și 3.691 mmoli Trolox/g (P16 - *Brassicaceae*, *Salicaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Apiaceae*).

Comparativ cu celelalte două metode testate, diferențele dintre valorile obținute prin metoda FRAP au fost semnificative ( $p < 0,05$ ). Valorile înregistrate au fost cuprinse între 0.563 mmol  $\text{Fe}^{II}$ /g (P2- *Fabaceae*, *Asteraceae* și *Lamiaceae*) și 6.321 mmol  $\text{Fe}^{II}$ /g (P10-*Myrtaceae*, *Scrophulariaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*).

Toate probele testate au avut activitate antibacteriană asupra tulpinilor testate, dar cel mai bun efect antimicrobian a fost înregistrat împotriva bacteriilor gram pozitive. Dintre acestea tulpinile de *Staphylococcus aureus* și *Paenibacillus alvei* au fost cele mai sensibile la acțiunea extractelor de păstură. O foarte bună activitate antimicrobiană a fost prezentă în cazul probeelor P6 (*Brassicaceae*, *Salicaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Apiaceae*) și P11 (*Salicaceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Tiliaceae*, *Asteraceae*, *Rosaceae*) împotriva bacteriilor gram pozitive.

În ceea ce privește bacteriile gram negative testate, *Pseudomonas aeruginosa*, a prezentat cea mai mare sensibilitate la acțiunea extractelor de păstură.

## CAPITOLUL 5. REZULTATE ȘI DISCUȚII

### REZULTATE ȘI DISCUȚII PRIVIND POLENUL ÎNAINTE ȘI DUPĂ FERMENTAȚIE

În cadrul acestui experiment s-a încercat reproducerea procesului natural de producere a păsturii în condiții de laborator și evaluarea calității produsului obținut.

Studii comparative polen – polen fermentat – păstură, privind compușii nutritivi (proteine, glucide, lipide) nu sunt suficiente, întorcând păstura, la fel ca și polenul este un produs extrem de complex, care posedă compuși biologic activi cu potențial antioxidant, antimicrobian și antitumoral dovedit (ABOUDA și colab., 2011; BALTRUŠAITYTE și colab., 2007; SOBRAL și colab., 2017). Astfel este foarte importantă ca rețeta să fie optimizată astfel încât să nu se piardă acești compuși valoroși pentru organismul uman.

#### Rezultate și discuții privind valoarea nutritivă

Carbhidrații totali au fost calculați prin diferență, după determinarea cenușii, a proteinelor și a lipidelor, iar valoarea energetică a polenului fermentat a avut o medie

de 429.12 kcal/100 g. Această valoare este comparabilă cu valoarea obținută pentru păstura naturală, 451.22 kcal/100 g.

În cazul tuturor probelor de polen fermentat pH-ul a scăzut (valoarea medie 4.06), iar aciditatea a crescut (valoarea medie 4.66 meq/kg) în urma procesului de fermentație, ajungând să fie similare cu cele din păstura naturală măsurate în cadrul acestei lucrări și anume pH-4.02 și aciditate 4.70 meq/kg.

### **Rezultate și discuții privind conținutul de compuși biologic activi**

Probele de polen fermentat au avut un conținut mai ridicat de aminoacizi liberi decât probele corespondente de polen, ceea ce dovedește ca în timpul procesului fermentativ a avut loc o hidroliză a proteinelor și astfel, deși conținutul total de proteine a scăzut, acestea s-au transformat în aminoacizi în urma proteolizei.

Valoarea cea mai ridicată a aminoacizilor din polen a fost identificată în proba BP3 (*Salvia officinalis*) și a avut o valoare de 3406.37 mg/100g, în timp ce în polenul fermentat valoarea a fost de 3629.85 mg/100g, Cel mai scăzut conținut de aminoacizi l-a avut proba BP2 (*Cistus sp.*) de 1598.19 mg/100g, după procesul fermentativ valoarea acestora crescând la 1696.83 mg/100g.

În probele de polen au fost identificați 12 acizi grași, dintre care acidul  $\alpha$  - linolenic a fost indentificat în cea mai mare cantitate. Analiza statistică a claselor de acizi grași nu au arătat diferențe semnificative ( $p < 0.05$ ) între probe de polen înainte și după fermentație. Diferențe semnificative au fost observate doar între probe, cel mai probabil datorită originii botanice diferite. Cele mai mari valori pentru acizii grași mononesaturați au fost observate în probele de polen BP1 cu polen predominant de *Ulex europaeus* și BP2 cu polen predominant de *Cistus sp.*, iar pentru cei polinesaturași în BP4 cu polen predominant de *Salix sp.*, *Prunus sp.*

Analiza statistică a datelor a confirmat faptul că între conținutul de polifenoli din probele de polen înaintea fermentației și după fermentație există diferențe semnificative. Fermentarea polenului de albine a dus la creșterea cantității de polifenoli totali în toate probele testate. Cantitatea de polifenoli totali înainte de fermentație a fost între 3.49-13.01 mg/g probă, iar după fermentație între 5.95-14.47 mg/g probă.

În ceea ce privește conținutul de flavonoide totale rezultatele obținute au arătat că fermentația a avut efect pozitiv asupra cantității acestora. Cantitatea de flavonoide înainte de fermentație a fost între 1.58-7.67 mg/g probă, iar după fermentație între 1.6-8.73 mg/g probă.

În toate probele analizate prin metoda HPLC/DAD se poate observa o creștere a compușilor flavonoidici în probele de polen fermentat. În ceea ce privește derivații acidului hidroxicinamic creșterea este și mai evidentă.

Derivații acidului hidroxicinamic au fost prezenți în aceste probe în cele mai mari cantități, în timp ce flavonoidele cum ar fi kamferolul-3-O-glicozidic, quercetina - 3-O-glicozid și Herbacetina-3-O glicozid au fost prezente într-o proporție mai mica.

Capacitatea antioxidantă testată prin metoda DPPH a variat în funcție de originea botanică a polenului. Polenul predominant de *Plantago sp.* și *Echium vulgare*

au avut cel mai bun efect antioxidant, urmat de cel de *Salvia officinalis*. În ceea ce privește activitatea antioxidantă a probelor de polen fermentat, s-a constatat o scădere a acesteia de 2.0-5.5 ori în toate probele.

Capacitatea de captare a radicalului ABTS a probelor de polen a fost semnificativ ( $p < 0.05$ ) mai ridicată în cazul probelor de polen decât în probele de polen fermentate. Probele de polen testate prin această metodă au demonstrat o variabilitate foarte mare a capacității antioxidante. Polenul de *Plantago sp.* și *Echium vulgare*, *Salvia officinalis* și *Ulex europaeus* au prezentat cele mai bune valori antioxidante.

În cazul metodei FRAP s-a constatat o creștere a potențialului antioxidant la probele de polen fermentat ceea ce indică faptul că modificările biochimice suferite de polen, afectează într-un mod pozitiv capacitatea antioxidantă a acestui produs. Cel mai bun efect antioxidant l-a avut proba cu polen predominant de *Plantago sp.* și *Echium vulgare*, *Cistus sp.* și *Ulex europaeus*.

Tulpinile de *Staphylococcus aureus* și *Paenibacillus alvei* au fost cele mai sensibile la acțiunea extractelor de polen și polen fermentat.

În ceea ce privește bacteriile gram negative, cel mai bun efect antimicrobian l-au avut proba BP2 care a avut în componență polen predominant de *Cistus sp.* și proba BP4 (*Salix sp.*, *Prunus sp.*) împotriva tulpinilor de *Escherichia coli* și *Pseudomonas aeruginosa*.

Efectul antimicrobian al probelor de polen și polen fermentat a fost comparabil, dar tendința pe alocuri, în funcție de tulpina testată, a fost să apară un efect antimicrobian mai ridicat în cazul polenului nefermentat.

## Concluzii și recomandări

Concluziile care au rezultat în urma analizelor efectuate în cadrul tezei de doctorat „Evaluarea potențialului bioactiv al păsturii obținute în laborator” sunt formulate din perspectiva celor două direcții principale de cercetare și sunt redată în cele ce urmează:

### Concluzii privind păstura naturală

Valoare energetică a păsturii este în stransă dependență de conținutul de lipide, proteine și carbohidrați și a fost cuprinsă între 424.58 și 473.45 kcal/100 g. Originea botanică a păsturii este un factor decisiv care influențează valoarea nutrițională a acesteia.

Variabilitatea concentrației compușilor fenolici (polifenoli totali și flavonoide totale) ai probelor de păstură analizate reflectă compoziția specifică speciei florale. În felul acesta se pot explica valorile diferite obținute, în cadrul analizelor efectuate, de la o probă la alta.

Toate rezultatele susțin afirmația că polifenolii sunt markeri chemotaxonomici pentru plante și fac analiza HPLC/DAD a profilului polifenolic, o analiză capabilă să identifice originea botanică a unei probe prin simpla analiză a spectrului obținut care a dat o amprentă unică, chiar și pentru păstură.

Variabilitatea capacității antioxidante a probelor de păstură este dată de compoziția diferită în compuși antioxidanți ai polenului care alcătuiește probele analizată. Potențialul antioxidant depinde foarte mult de condițiile specifice fiecărui sistem testat.

Toate probele testate au avut activitate antibacteriană asupra tulpinilor testate, dar cel mai bun efect antimicrobian a fost înregistrat împotriva bacteriilor gram pozitive. Dintre acestea tulpinile de *Staphylococcus aureus* și *Paenibacillus alvei* au fost cele mai sensibile la acțiunea extractelor de păstură. În ceea ce privește bacteriile gram negative testate, *Pseudomonas aeruginosa*, a prezentat cea mai mare sensibilitate la acțiunea extractelor de păstură.

Păstura vine cu un aport ridicat de proteine și aminoacizi esențiali, acizi grași mono- și polinesaturați și o cantitate ridicată de polifenoli și flavonoide, fiind un produs al stupului cu o biodisponibilitate ridicată. Putem concluziona faptul că păstura poate fi considerată și utilizată ca și un supliment alimentat, aducând un aport de substanțe biologice importante pentru organismul uman.

### **Concluzii privind polenul fermentat**

Polenul de albine este un substrat adecvat pentru fermentația în stare solidă, deoarece are toate substanțele nutritive necesare pentru a asigura o creștere eficientă a microorganismelor și, conform rezultatelor obținute, polenul de albine este un substrat potrivit pentru realizarea acestui bioproces la un nivel industrial.

Valoarea energetică a polenului fermentat a avut o valoare medie de 429.12 kcal/100 g comparabilă cu valoarea obținută pentru păstura naturală.

Polenul fermentat a avut o valoare a pH-ului mult mai scăzută decât polenul de albine și o valoare a acidității mult mai ridicată respectând regula conform căreia acești doi parametri sunt invers proporționali.

Fermentarea polenului de albine a dus la creșterea cantității de polifenoli totali și de flavonoide totale cu 1-2.5 ori în toate probele testate.

Deși conținutul de polifenoli și flavonoide a crescut în probele de polen fermentat s-au înregistrat scăderi ale capacității antioxidante testate prin metodele DPPH și TEAC și creșterea capacității de captare a radicalului feric. Aceste observații sunt extrem de interesante și dovedesc faptul că, pe lângă cantitatea compușilor polifenolici un aspect important îl constituie calitatea acestora. De asemenea este întărită ideea conform căreia potențialul antioxidant este dat și de alte substanțe din componența unei probe.

Efectul antimicrobian al probelor de polen și polen fermentat a fost comparabil, dar tendința pe alocuri, în funcție de tulpina testată, tendința să apară un efect antimicrobian mai ridicat în cazul polenului nefermentat.

Bacteriile gram-pozitive care au prezentat cea mai mare sensibilitate la extractele testate au fost *Staphylococcus aureus* și *Paenibacillus alvei*, iar dintre cele gram-

negative polenul fermentat a avut cel mai bun efect împotriva *Pseudomonas aeruginosa*, iar polenul împotriva *E. coli*.

Toate acestea arată că polenul fermentat poate fi utilizat ca și supliment alimentar aducând un aport de substanțe biologice importante pentru organismul uman.

## Elementele de originalitate ale tezei

Elementele de originalitate ale prezentei teze de doctorat sunt:

- ✓ Studiul profilului polifenolilor din păstura românească, utilizând metoda HPLC/DAD;
- ✓ Dovedirea corelației între originea botanică și compușii polifenolici prin studiul profilului polifenolilor din polen provenit de la plante de *Brassica napus* și din probe de păstură care au avut în componență predominant polen de *Brassica napus* (peste 97%).
- ✓ Studiul influenței procesului de fermentație asupra calităților nutritive și a compușilor biologici activi din polen prin utilizarea unor tehnici avansate (HPLC/DAD, LC/MS, GC/MS).
- ✓ Studiul comparativ al acizilor grași și al aminoacizilor din polen înainte și după fermentație.
- ✓ Studiul comparativ al activității antimicrobiene din polen înainte și după fermentație.

## Perspective de viitor

Din cercetările realizate în cadrul prezentei teze de doctorat se desprind următoarele direcții noi de cercetare:

- Optimizarea protocolului de producere a păsturii artificiale pentru obținerea unui produs cu calitate superioare celui natural (conținut mai mare de aminoacizi sau vitamine sau acizi grași) și brevetarea acestuia;
- Efectuarea de studii de analiză senzorială a acestui produs și dezvoltarea de alternative pentru îmbunătățirea acestuia sau pentru includerea în alte tipuri de alimente care fac deja parte din spectrul de consum al populației;
- Evaluarea a potențialului probiotic al păsturii și al păsturii artificiale prin tehnici *in vitro* și *in vivo* și testarea digestibilității acestui produs;
- Studiul acesta poate fi reprodus cu diferite probe de păstură din diferite țări, odată ce sunt confirmate constatările anterioare și anume că originea botanică influențează conținutul de polifenoli al polenului de albine și apariția specifică a acestora în încărcăturile de polen monofloral, dar și faptul că pot fi polifenoli considerați un instrument extrem de util pentru identificarea originii botanice a polenului.
- Stabilirea unor parametri de calitate pentru standardizarea păsturii românești.





---

ABSTRACT OF PhD THESIS

# Assessment of the bioactive potential of bee bread

---

PhD Student **Adriana Cristina Urcan**

---

Scientific coordinator **Prof. Univ. Dr. Ing. Liviu Alexandru Mărghițaș**

---



## **INTRODUCTION**

Bee products have been used for centuries in both human diet and traditional medicine due to their nutritional and physiological properties and their beneficial effects on the human body (KROYER și HEGEDUS, 2001).

In order to obtain bee bread, the bees press the collected pollen into the cells of the honeycombs, to which they add saliva, nectar and honey (BOGDANOV, 2016). The pollen mixture under the influence of temperature, enzymes and natural pollen microbiota turns into bee bread which is the main protein source for the honey bees (BRODSCHNEIDER, 2010).

Previous studies have shown that bee bread has a higher bioavailability than bee pollen and is more easily digested by the human body representing a natural source of proteins and amino acids, therefore it gained more and more popularity among consumers lately.

Bee bread extraction methods are extremely invasive, involving the destruction of the honeycomb, and extraction yield is very low, which is why emerging biotechnologies have sought alternative methods for obtaining this product.

It is also extremely important to know in detail the potential of natural bee bread and to propose a quality standard for this product in order to create bee bread with similar or even superior characteristics.

The scientific research undertaken in this work was motivated by the need to obtain and characterize a pollen-based bioactive product that is a link between human health, food biotechnology and applied research and to help the consumer to accept such product.

In this context, the present work wants to bring an important contribution in the study of natural bee bread and bee bread products in terms of chemical composition and biologically active compounds with antioxidant and antimicrobial properties.

## **PURPOSE AND OBJECTIVES OF THE THESIS**

The purpose of the PhD thesis "Assessment of the bioactive potential of bee bread" was to develop a functional bee bread type product with similar characteristics to the natural one by exploiting the fermentable potential of bee pollen and highlighting its nutritional principles and biological properties before and after the fermentation process.

## OBJECTIVES

The literature studies that demonstrate the nutritional and bioactive properties of bee bread are few, this is why two research directions have been approached within this thesis to achieve the established objectives.

To obtain bee bread in the laboratory, with similar characteristics to the natural one, it is necessary first of all to know the nutritional value and the biological potential of the natural bee bread, and due to the absence of a quality standard for this product, the first research direction was represented by the characterization of natural bee bread by:

- Quantification of compounds that give the nutritional value of bee bread;
- Correlation of the botanical origin of bee bread with the profile of biologically active compounds;
- Study of the bioactive potential of bee bread, by determining the antioxidant and antimicrobial capacity.

The second direction of research was the exploitation of bee pollen as a fermentable substrate for solid state fermentation in order to obtain a functional product. In order to achieve the purpose, the following specific objectives were set:

- Establishment of a work protocol for obtaining a bee bread-like product;
- Study of the effect of fermentation on pollen nutrients;
- Quantification of biologically active compounds from bee pollen before and after fermentation and their correlation with botanical origin of pollen;
- Study of the biological properties of pollen by comparison, before and after the fermentation process.

## THESIS STRUCTURE

The PhD thesis "Assessment of the bioactive potential of bee bread" is structured in two main parts.

In the first part, Chapters 1 and 2, represented by literature review, is presented in accordance with the proposed objectives, dealing with aspects related to bee bread and artificially obtained bee bread with emphasis on chemical composition, biologically active compounds of the polyphenols class and antioxidant and antimicrobial activity. The second part (Chapters 3-6) includes the personal contribution, results, discussions, conclusions and future perspectives for research regarding bee pollen and bee bread. The total number of tables in this thesis is 34 and the total number of figures is 59.

The first part, **LITERATURE REVIEW**, regarding bee bread and fermented pollen, is structured in two chapters.

**Chapter 1** contains three subchapters in which, following the synthesis of data from the literature, the general concepts of bee bread, chemical composition, biologically active compounds and therapeutic properties are presented.

**Chapter 2** encompasses the current state of knowledge in terms of obtaining bee bread under laboratory conditions. From the published literature study, bee pollen is an excellent substrate for fermentation, rich in simple carbohydrates, proteins and lipids, but unfortunately it is not harnessed to its true potential. The literature is extremely poor in information on the characterization of fermented pollen.

The second part consists of the **ORIGINAL RESEARCH** and is structured in four chapters summarizing two conclusive studies.

**Chapter 3 MATERIALS AND METHODS.** The five subchapters describe the biological material and the experimental methods used during the research within the doctoral thesis for the characterization of bee bread and fermented pollen.

**Chapters 4 and 5 RESULTS AND DISCUSSIONS.** Each chapter consists in five subchapters, presenting the obtained results regarding the nutritional value and the biological activities of bee bread (Chapter 5) and fermented pollen (Chapter 6), as well as the statistical interpretation of the data obtained from these studies.

**Chapter 6 CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS.** It includes the conclusions and recommendations which emerged from the research carried out within the PhD thesis, and finally the elements of originality of the thesis and prospects for the future are stated.

## **ORIGINAL RESEARCH**

### **Chapter 3. MATERIALS AND METHODS**

#### **3.1. BIOLOGICAL MATERIAL**

The biological material used to perform the experiments consists in bee bread and bee pollen samples obtained directly from beekeepers or specialized apiculture products trade. Until the analysis, the samples were stored in the freezer at -18 °C to prevent degradation.

The research was carried out in the Laboratory of Quality Control for Bee Products (APHIS), Institute of Life Sciences, UASMV Cluj-Napoca, Biochemistry Department UASMV Cluj-Napoca and at Coimbra University (Faculty of Pharmacy), Portugal.

### **CHAPTER 4. RESULTS AND DISCUSSIONS**

#### **RESULTS AND DISCUSSIONS REGARDING BEE BREAD**

In this chapter are presented the research results obtained for natural bee bread. Statistical analysis revealed that there were statistically significant differences between bee bread samples ( $p < 0.05$ ), these variations being directly influenced by the botanical origin of the analyzed samples.

According to the pollinological analysis, all analytical samples were classified as polyfloral having different pollen types and percentages, except P5 and P8 samples which were monofloral: > 95% pollen of *Brassica napus* (rape).

#### **Results and discussions regarding the nutritional value of bee bread**

Total carbohydrates were calculated by difference, after determination of ash, proteins and lipids. Based on the results obtained, it is estimated that the energy value associated with bee bread consumption averages 451.22 kcal/100 g.

The average of pH value of the analyzed bee bread was 4.02 and the acidity averaged 4.70 meq / kg. The low pH value helps for conserving the product, so the bee bread is less perishable than bee pollen.

### **Results and discussions regarding the content of biologically active compounds**

A total of 28 free amino acids were identified and quantified by LC-MS method from bee bread samples. In the analyzed samples the nine essential amino acids were identified (threonine, methionine, lysine, histidine, valine, tryptophan, leucine, phenylalanine and isoleucine).

Sample P1 (*Rosaceae, Salicaceae, Fagaceae*) was characterized by the highest amount of free amino acids, 5385.97 mg/100g, while the P12 sample (*Salicaceae, Fabaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Lamiaceae*) had 697.87 mg/100g of total free amino acids. Such a variation in amino acid content is influenced by floral origin, biological, ecological and geographic factors during production, as well as handling and storage conditions of bee bread.

In the analyzed lipid extracts, 12 fatty acids were identified by GS-MS method. The  $\alpha$  - linolenic acid was identified in the highest amount and had values between 18.11% in P7 (*Fabaceae, Tiliaceae, Asteraceae, Plantaginaceae*) and 82.77% in P4 (*Brassicaceae, Asteraceae, Rosaceae, Salicaceae, Fagaceae, Apiaceae*), followed by palmitic acid (16: 0) with values ranging from 10.48% in P1 (*Rosaceae, Salicaceae, Fagaceae*) and 46.66% in P7 (*Fabaceae, Tiliaceae, Asteraceae, Plantaginaceae*) and linoleic acid with values between 1.29% in P5 (*Brassicaceae*) and 32.46% in P10 (*Myrtaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae* and *Gramineae*). Capric acid, lauric, myristic acid, stearic acid, oleic acid, elaidic acid, narachidic acid, behenic acid and erucic acid have been identified in smaller quantities (<3%).

The amount of polyphenols in the Romanian bee bread extracts ranged between 6.31 mg GAE / g in P14 (*Boraginaceae, Fabaceae, Brassicaceae, Plantaginaceae, Lamiaceae*) and 16.12 mg GAE/g in P17 (*Brassicaceae, Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Salicaceae*), and in the case of Indian bee bread extracts the values were similar, 5.67 mg GAE / g in P9 (*Myrtaceae*) and 15.34 mg GAE/g in P10 (*Myrtaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae, Gramineae*).

Values of total flavonoids ranged from 0.22 mg Qe/g in sample P2 (*Fabaceae, Asteraceae, Lamiaceae*) to 13.39 mg Qe/g in sample P9 (*Myrtaceae-Eucalyptus sp.*) With an average of 4.16 mg Qe/g per bee bread. The total flavonoid content obtained for the Romanian bee bread sample, identified as predominant pollen of *Brassica sp.* (97%) was 5.01 mg QE/g, and for the equivalent breed sample from India the value was similar, 5.02 mg QE/g. The highest amount of flavonoids, 13.39 mg Qe/g per bee bread, was identified in sample P9, which had as predominant pollen *Eucalyptus sp.*

In this paper it was tried for the first time to identify the botanical origin of bee bread with the help of the polyphenolic fingerprinting previously done only for bee pollen.

The HPLC/DAD technique has proved to be convenient for identifying the botanical origin of the analyzed samples and useful in characterizing its predominant constituents. For monofloral samples, these chromatograms were sufficient to distinguish pollen species after being compared with the references in the existing database. Thus, flavonoids, already recognized as biochemical markers of plants (TOMAS-BARBERAN et al., 1988), are used here as markers of the floral species corresponding to the studied samples.

All flavonoids identified in bee bread samples are flavones or derivatives of flavonoids. These flavonoids when are linked to carbohydrates appear as O-glycosides. Regarding the polyphenols identified, they are predominantly derivatives of hydroxycinnamic acid.

The HPLC/DAD profile obtained for bee bread from Romania and India, both consisting of *Brassica sp.* pollen as the main taxon (<97%), were identical. The UV spectra of compounds 1 and 2 correspond to glycosidic flavonols at C3 carbon and are both 3-o-Kamferol derivatives. All other compounds are derivatives of hydroxycinnamic acid (data according to CAMPOS AND MARKHAM, 2007) with a high probability of polymerized structures such as spermidine polyamides.

In addition to rape pollen bee bread samples, pollen derived from rape plants was also analyzed to demonstrate, by comparison of the chromatographic profile of hand collected pollen, bee pollen and bee bread, if saliva of the bees and fermentation process affects in some way the composition of flavonoids by enzymatic action. From the data obtained, the profile was maintained in all analyzed samples.

In the sample of bee bread with pollen of *Eucalyptus sp.* the flavonoids characteristic for this floral species have been identified: two flavonols quercetin 3-O sofosoride (compound 1) and myristin (compound 4) and two flavones, tricetine (compound 5) and luteolin (compound 6). Tricetin is a biomarker for *Myrtaceae* (CAMPOS et al., 2002).

In contrast to the HPLC/DAD profiles identified for monofloral samples which contain predominant pollen of a particular specie, for polyfloral samples, it was extremely difficult to find a correct correspondence between the profile (highly complex) and the botanical origin of the pollen.

In this paper, it was reported for the first time that this phenolic profile remains unchanged for floral pollen (hand collected), bee pollen and bee bread. Despite the biochemical transformations occurring during bee bread fermentation, it seems that these phenolic compounds are not affected and remain unchanged. Also, variables like soil and climate do not seem to influence these compounds in the case of studied samples.

The antioxidant activity of the bee bread samples was tested by three complementary methods: DPPH, TEAC and FRAP. The complementary approach of this analysis was made with the idea of comparing and correlating the obtained results.

DPPH radical scavenging capacity of bee bread samples was between 0.402 mmol Trolox/g bee bread (P2 - *Fabaceae*, *Asteraceae* and *Lamiaceae*) and 1.966 mmol Trolox/g bee bread (P17 - *Brassicaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae* and *Salicaceae*).

Regarding ABTS radical scavenging capacity bee bread samples have demonstrated a very high variability in terms of antioxidant capacity. The values obtained were in the range of 0.891 mmol Trolox/g (P14 - *Boraginaceae*, *Fabaceae*, *Brassicaceae*, *Plantaginaceae*, *Fabaceae*) and 3.691 mmol Trolox/g (P16 - *Brassicaceae*, *Salicaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae* and *Apiaceae*).

Compared to the other two methods tested, the differences between the values obtained by the FRAP method were significant ( $p < 0.05$ ). The recorded values were between 0.563 mmol  $\text{Fe}^{II}$ /g (P2-*Fabaceae*, *Asteraceae* and *Lamiaceae*) and 6.321 mmol  $\text{Fe}^{II}$ /g (P10-*Myrtaceae*, *Scrophulariaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*).

All of the tested samples had antibacterial activity on the tested bacteria strains, but the best antimicrobial effect was recorded against gram positive bacteria. Of these, *Staphylococcus aureus* and *Paenibacillus alvei* were most sensitive to the action of bee bread extracts. A very good antimicrobial activity was present in the case of P6 (*Brassicaceae*, *Salicaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Apiaceae*) and P11 (*Salicaceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Tiliaceae*, *Asteraceae*) against gram positive bacteria. From the gram negative bacteria tested, *Pseudomonas aeruginosa* showed the highest susceptibility to the action of bee bread extracts.

## **CHAPTER 5. RESULTS AND DISCUSSIONS**

### **RESULTS AND DISCUSSIONS REGARDING THE POULLEN BEFORE AND AFTER FERMENTATION**

In this experiment, it was attempted to reproduce the natural process of bee bread production under laboratory conditions and to evaluate the quality of the obtained product.

Comparative studies, pollen - fermented pollen – bee bread, regarding the nutritional compounds (proteins, carbohydrates, lipids) are not enough, bee bread, as pollen, is an extremely complex product possessing biologically active compounds with antioxidant, antimicrobial and antitumor potential (ABOUDA et al., 2011; BALTRUŠAITYTE et al., 2007; SOBRAL et al., 2017). Thus, it is very important that the formulation to be optimized in such a way that there is no loss of valuable compounds for the human body.

### **Results and discussions regarding the nutritional value**

Total carbohydrates were calculated by difference after determination of ash, protein and lipids, and the energy value of the fermented pollen averaged 429.12

kcal/100 g. This value is comparable to the value obtained for natural bee bread, 451.22 kcal/100 g.

For all fermented pollen samples, the pH decreased (mean value 4.06) and acidity increased (mean value 4.66 meq/kg) following the fermentation process, similar to the natural bee bread measured in this paper pH-4.02 and an acidity of 4.70 meq/kg.

### **Results and discussions regarding the content of biologically active compounds**

Fermented pollen samples had a higher content of free amino acids than the corresponding pollen samples, proving that during the fermentation process protein hydrolysis occurred and thus, although the total protein content decreased, they turned in amino acids following proteolysis.

The highest amount of total free amino acid value was identified in the sample BP3 (*Salvia officinalis*) and had a value of 3406.37 mg/100g, while in the fermented pollen the value was 3629.85 mg/100g. The lowest amino acid content was in the sample BP2 (*Cistus sp.*) of 1598.19 mg /100g and after the fermentation process their value increased to 1696.83 mg/100g.

In the pollen samples 12 fatty acids were identified, of which  $\alpha$ -linolenic acid was identified in the largest amount. The statistical analysis of fatty acid classes did not show significant differences ( $p < 0.05$ ) between pollen samples before and after fermentation. Significant differences were observed only between samples, most likely due to different botanical origins. The highest values for monounsaturated fatty acids were observed in pollen samples BP1 having pollen predominantly of *Ulex europaeus* and BP2 havng predominant pollen of *Cistus sp.* and for polyunsaturates in BP4 having predominant pollen of *Salix sp.*, *Prunus sp.*

The statistical analysis of the data confirmed that there are significant differences between the content of polyphenols in the pollen samples before and after fermentation. Bee pollen fermentation has increased the total polyphenols in all tested samples. The total amount of polyphenols before fermentation was between 3.49-13.01 mg/g sample and after fermentation between 5.95-14.47 mg/g sample.

Concerning the total flavonoid content, the results showed that the fermentation had a positive effect on their quantity. The amount of flavonoids prior to fermentation was between 1.58-7.67 mg/g sample and after fermentation between 1.0-8.73 mg/g sample.

In all samples analyzed by HPLC/DAD method, an increase in flavonoid compounds in the fermented pollen samples can be observed. Regarding the hydroxycinnamic acid derivatives, the increase is even more evident. Hydroxycinnamic acid derivatives were present in these samples in the largest amounts, while flavonoids such as kaempherol-3-*O*-glycoside, quercetin-3-*O*-glycoside and herbacetin-3-*O*-glycoside were present in lower proportion.



The antioxidant capacity tested by DPPH method varied according to botanical botany of pollen. The sample with predominant pollen of *Plantago sp.* and *Echium vulgare* had the best antioxidant effect, followed by *Salvia officinalis*. Regarding the antioxidant activity of the fermented pollen samples, there was a decrease of 2.0-5.5 times in all samples.

ABTS radical scavenging capacity of pollen samples was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than in fermented pollen samples. Pollen samples tested by this method have demonstrated a very high variability of the antioxidant capacity. The sample with predominant pollen of *Plantago sp.* and *Echium vulgare*, *Salvia officinalis* and *Ulex europaeus* showed the best antioxidant values.

In the case of the FRAP method, there was an increase in the antioxidant potential in fermented pollen samples which indicates that the biochemical changes suffered by pollen affects in a positive way the antioxidant capacity of this product. The sample with predominant pollen of *Plantago sp.* and *Echium vulgare*, *Cistus sp.* and *Ulex europaeus* had the best antioxidant effect.

*Staphylococcus aureus* and *Paenibacillus alvei* were most sensitive to the action of pollen extracts and fermented pollen.

Regarding Gram-negative bacteria, the best antimicrobial effect had the BP2 sample which had predominantly pollen of *Cistus sp.* and the sample BP4 (*Salix sp.*, *Prunus sp.*) against the strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

The antimicrobial effect of pollen and fermented pollen samples was comparable, but the trend, depending on the tested bacterial strain, showed that the antimicrobial effect was higher for unfermented pollen.

## Conclusions and recommendations

The conclusions that resulted from the analysis of the PhD thesis "Evaluation of the Bioactive Potential of Pasture in the Laboratory" are formulated from the perspective of the two main research directions and are presented in the following:

### Conclusions regarding natural bee bread

The energy value of pasture is closely related to the lipid, protein and carbohydrate content and ranged from 424.58 to 473.45 kcal/100 g. The botanical origin of bee bread is an important factor that influences the nutritional value thereof.

The variability in the concentration of phenolic compounds (total polyphenols and total flavonoids) of the analyzed bee bread samples reflects the floral species specific composition. In this way, it can be explained the different values obtained from one sample to another.

All results support the statement that polyphenols are chemotaxonomic markers for plants and make HPLC/DAD analysis of the polyphenolic profile, an analysis capable to identify the botanical origin of a sample by simply analyzing the obtained spectrum that gave a single fingerprint, even for bee bread.

The variability of the antioxidant capacity of bee bread samples is given by the different composition in the antioxidant compounds of the pollen that is part of the analyzed samples. The antioxidant potential depends very much on the conditions specific to each tested system.

All of the tested samples had antibacterial activity on the strains tested, but the best antimicrobial effect was recorded against gram positive bacteria. Of these, *Staphylococcus aureus* and *Paenibacillus alvei* were the most sensitive to the action of bee bread extracts. Concerning gram negative bacteria tested, *Pseudomonas aeruginosa*, showed the greatest sensitivity to the action of bee bread extracts.

Bee bread comes with a high intake of proteins and essential amino acids, mono- and polyunsaturated fatty acids and a high amount of polyphenols and flavonoids, being a product of the hive with a high bioavailability. We can conclude that bee bread can be considered and used as a diet supplement, bringing a contribution of biological substances important to the human organism.

### **Conclusions on fermented pollen**

Bee pollen is a suitable substrate for solid state fermentation because it has all the nutrients necessary to ensure effective microorganisms growth and, according to the results obtained, bee pollen is a suitable substrate for making this bioprocess at an industrial level.

The energy value of the fermented pollen had an average value of 429.12 kcal/100 g comparable to the value obtained for natural bee bread.

Fermented pollen had a pH value much lower than bee pollen and a much higher acidity value, following the rule that these two parameters are inversely proportional.

Fermentation of bee pollen has increased the amount of total polyphenols and total flavonoid content by 1-2.5 times in all tested samples.

Although the content of polyphenols and flavonoids increased in fermented pollen samples, a decrease in antioxidant capacity by DPPH and TEAC methods was observed and increased values for FRAP method were observed. These observations are extremely interesting and show that besides the amount of polyphenolic compounds an important aspect is their quality. The idea that the antioxidant potential is also given by other substances in the composition of a sample is also reinforced.

The antimicrobial effect of bee pollen and fermented bee pollen samples was comparable, but the tendency, depending on the strain tested, tends to show an increased antimicrobial effect of unfermented pollen.

The Gram-positive bacteria that showed the highest sensitivity to the tested extracts were *Staphylococcus aureus* and *Paenibacillus alvei*, and against Gram-negative fermented pollen had the best effect against *Pseudomonas aeruginosa*, while pollen had against *E. coli*.

All of these results show that fermented pollen can be used as a dietary supplement, bringing an important biological input to the human body.

### **The originality elements of the thesis**

The originality elements of this PhD thesis are:

- ✓ Study of the profile of polyphenols in Romanian bee bread using the HPLC/DAD method;
- ✓ Demonstration of correlation between botanical origin and polyphenolic compounds by studying polyphenol profile of pollen from *Brassica napus* plants and bee bread samples consisting predominantly of *Brassica napus* pollen (over 97%).
- ✓ Study of the influence of the fermentation process on the nutritional qualities and biologically active compounds in bee pollen using advanced techniques (HPLC/DAD, LC/MS, GC/MS).
- ✓ Comparative study of fatty acids and amino acids of bee pollen before and after fermentation.
- ✓ Comparative study of antimicrobial activity of bee pollen before and after fermentation.

### **Perspectives of the future**

From the research carried out within the present PhD thesis, the following new research directions are detached:

- Optimizing the protocol for the production of artificial bee bread in order to obtain a product of superior quality to the natural one (higher content of amino acids or vitamins or fatty acids) and patenting it;
- Performing studies of sensorial analysis of this product and developing alternatives to improve it or to include it in other types of food that are already part of the population's consumption spectrum;
- Assessing the probiotic potential of bee bread and artificial bee bread by *in vitro* and *in vivo* techniques and testing the digestibility of this product;
- This study can be reproduced with different bee bread samples from different countries once the previous findings are confirmed, namely that the botanical origin influences the polyphenols content of pollen bees and their specific occurrence in the monofloral pollen loads, but also the fact that they can be polyphenols considered an extremely useful tool for identifying the botanical origin of pollen.
- Establishing quality parameters for the standardization of Romanian bee bread.