



Universitatea Națională de Știință și Tehnologie  
Politehnica București

## Teză de doctorat

Coordonator:

Prof. dr. ing. Vasile Lavric

Author:

M. Sc. Mădălina-Maria Nichitoi

**București**  
**2023**



**UNIVERSITATEA NAȚIONALĂ DE ȘTIINȚĂ ȘI TEHNOLOGIE**

**POLITEHNICA BUCUREȘTI**

**Școala Doctorală de Inginerie Chimică și Biotehnologii**

**REZUMAT TEZĂ**

**VALORIFICAREA SUPERIOARĂ A PRODUSELOR  
APICOLE**

Coordonator:

Prof. dr. ing. Vasile Lavric

Autor:

M.Sc. Mădălina-Maria Nichitoi

**București  
2023**

## MULȚUMIRI

Doresc să-mi exprim recunoștința față de conducătorul meu de teză, prof. univ. dr. ing. Vasile Lavric, pentru tema de cercetare complexă și interesantă pe care mi-a sugerat-o și pentru oportunitatea de a continua studiile doctorale în cadrul departamentului de Inginerie Chimică și Biochimică. Îi sunt sincer recunoscătoare pentru îndrumarea și sprijinul său nemijlocit pe tot parcursul cercetării mele.

Aș dori, de asemenea, să-mi exprim aprecierea față de membrii comitetului de cercetare:

- către Prof. dr. ing. Raluca Daniela Isopescu pentru tot sprijinul acordat în ceea ce privește modelarea matematică și statistică. De asemenea, îi sunt recunoscătoare pentru îndrumarea și sprijinul acordat;

- către Prof. dr. ing. Ana Maria Josceanu pentru asistența acordată în analizele spectrometrice și cromatografice din cadrul Departamentului de Chimie Analitică și Ingineria Mediului, precum și pentru tot efortul depus în vederea susținerii activității mele de cercetare;

- pentru Asist. dr. ing. Gabriela Olimpia Isopencu pentru cunoștințele și tot ajutorul acordat în ceea ce privește analizele microbiologice efectuate și interpretarea rezultatelor, în cadrul departamentului de Inginerie Chimică și Biotehnologii.

Această cercetare nu ar fi fost posibilă fără conducerea Centrului de Cercetare pentru Analiză Instrumentală SCIENT, Ilfov, România și conducerea Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Criogenie și Tehnologii Izotopice - ICSI Rm. Vâlcea, care a facilitat aspectele experimentale ale acestei lucrări științifice.

Mulțumiri speciale doctorului în fizică Teodor Alexandru Costache (SCIENT) și doctorului în chimie Elisabeta Irina Geană (ICSI) pentru colaborare, sprijin și comentarii constructive în ceea ce privește analiza cromatografică a extractelor de propolis.

Sunt profund recunoscătoare familiei și prietenilor mei pentru sprijinul necondiționat, înțelegerea și încrederea deplină pe care mi-au acordat-o în toți acești ani de studiu la Universitatea Politehnica din București.

Vă mulțumesc din suflet tuturor pentru răbdarea și implicarea în activitatea mea de cercetare.

Autor

## Cuprins

<b>Capitolul 1 - Prezentarea obiectului cercetării, a metodelor și conceptelor utilizate.....</b>	<b>4</b>
1.1. Propolisul - principalul produs apicol .....	4
1.1.1. Compoziția propolisului și efectele sale asupra sănătății umane .....	5
1.2. Metode de extracție a compușilor valoroși din propolis.....	9
1.2.1. Extracția clasică.....	10
1.2.2. Extracție Soxhlet .....	12
1.2.3. Extracție asistată de ultrasunete.....	12
1.2.4. Extracția asistată de microunde .....	15
1.2.5. Extracția cu fluide supercritice .....	15
1.3. Metode analitice pentru cuantificarea acizilor polifenolici și a flavonoidelor din extractele de propolis.....	16
1.3.1. Metode spectrofotometrice .....	16
1.3.2. Tehnici cromatografice .....	17
1.4. Metode de evaluare a activității antioxidante și antimicrobiene .....	19
1.4.1. ABTS.....	19
1.4.2. DPPH.....	20
1.4.3. FRAP .....	21
1.4.4. Difuzie pe disc .....	21
1.4.5. A doua metodă recomandată pentru determinarea activității antimicrobiene .....	23
1.5. Instrumente matematice pentru prelucrarea avansată a datelor .....	24
1.5.1. Instrumente de statistică descriptivă pentru tratarea primară a datelor experimentale...24	
1.5.2. Instrumente statistice multivariate.....	24
1.5.2.1. Analiza componentelor principale .....	25
1.5.2.2. Analiza discriminantă liniară .....	26
1.5.2.3. Regresia prin metoda celor mai mici pătrate parțiale .....	28
1.5.3. Modelarea și estimarea parametrilor pentru proprietățile semnificative.....	28
<b>Capitolul 2 - Extracte de propolis românesc: caracterizare și analiză și modelare     statistică .....</b>	<b>41</b>
<b>Capitolul 3 – Efectele profilului polifenolic asupra activității antioxidante și antimicrobiene a     extractelor de propolis.....</b>	<b>42</b>
<b>Capitolul 4 - Efectele câmpului ultrasonic asupra profilului polifenolic al extractelor de propolis     îmbunătățesc activitatea lor antioxidantă și antimicrobiană? .....</b>	<b>76</b>
<b>Concluzii generale .....</b>	<b>99</b>
<b>Contribuții originale .....</b>	<b>100</b>
<b>Diseminarea rezultatelor cercetării.....</b>	<b>102</b>

Cuvinte-cheie: propolis, profil polifenolic, flavonoide, macerare, extracție cu ultrasunete, capacitate antioxidantă, activitate antimicrobiană, ABTS, DPPH, UHPLC-MS, statistica multivariată

## Introducere

Teza de doctorat este redactată în format "articol" și este structurată în 4 părți principale.

Prima parte, reprezentată de **Capitolul 1**, prezintă un studiu de literatură cu privire la obiectul cercetării, metodele și conceptele utilizate pentru a descrie proprietățile propolisului, precum și mecanismele care stau la baza acțiunii antioxidante, antitumorale și antimicrobiene a acestuia, clasificarea polifenolilor și modul de acțiune al acestora. Au fost descrise metodele de extracție a polifenolilor, comparând extracția convențională cu cea asistată de ultrasunete și evidențiind factorii care influențează procesul de extracție. De asemenea, sunt prezentate tehnicile utilizate pentru a determina compoziția propolisului, capacitatea antioxidantă și activitatea antimicrobiană. În finalul acestui capitol sunt descrise instrumentele matematice pentru prelucrarea avansată a datelor obținute experimental pe parcursul activității de cercetare.

A doua parte a lucrării, partea originală, constă în trei articole complete publicate ca rezultate științifice ale tezei de doctorat (Capitolul 2, Capitolul 3 și Capitolul 4).

Scopul studiului prezentat în **Capitolul 2** a fost de a evalua compoziția propolisului românesc și de a identifica dacă condițiile blânde, care implică solvenți ecologici, conduc la rezultate semnificative. Au fost aplicați diferiți parametri operaționali și a fost studiat efectul acestora asupra compoziției extractului. Trei fracții masice egale conținând particule de propolis de dimensiuni fine ( $d < 600 \mu\text{m}$ ), medii ( $600 \mu\text{m} < d < 1,25 \text{ mm}$ ) și mari ( $d > 1,25 \text{ mm}$ ) au fost supuse macerării cu apă demineralizată și etanol 50%, la 150 rpm și 25 °C, asigurându-se un raport lichid:solid de 10:1. Durata extracției a variat între 1 și 7 zile. Extractele au fost evaluate din punct de vedere al polifenolilor, flavonoizilor și al capacității antioxidante. Spectrele de absorbție înregistrate în domeniul 200 - 500 nm au fost supuse Analizei Componentelor Principale, Analizei Discriminante Liniare și regresiei prin Metoda celor mai mici pătrate parțiale. Analiza statistică a permis clasificarea eșantioanelor, în principal pe baza naturii extractantului, și a pus în evidență posibilitatea de a lega principalele proprietăți în ceea ce privește conținutul de flavonoizi și polifenoli și capacitatea antioxidantă de caracteristicile spectrale.

În **Capitolul 3** este prezentat studiul realizat pe extractele de propolis, obținute prin macerare, pentru a identifica relația dintre profilul derivaților polifenolici și activitatea antioxidantă și antimicrobiană a acestora. Extractele au fost obținute folosind apă și soluții etanolice de 25%, 50% și 70% (g/g), la un raport lichid: solid de 2:1, 4:1 și 6:1 (g/g). Derivații polifenolici au fost cuantificați prin tehnica UHPLC-MS. Eficiența antimicrobiană a fost testată împotriva bacteriilor Gram-pozitive (*B. subtilis*), Gram-negative (*E. coli*) și a ciupercilor (*C. albicans*) prin metoda difuziei în disc. Pentru a evalua contribuția diferitelor principii bioactive la formarea capacității antioxidante a extractelor, au fost utilizate metode chemometrice și un model de tip saturație.

**Capitolul 4** are ca scop găsirea condițiilor optime pentru extracția compușilor polifenolici din propolis, utilizând sonicarea ca tehnică de intensificare, în condiții izoterme. Parametrii de operare au fost timpul de expunere la ultrasunete, raportul lichid:solid și concentrația solventului etanolic. Totodată s-a dorit investigarea influenței câmpului ultrasonic și a timpului de expunere asupra profilului standard al derivaților polifenolici. Datele studiului prezentat în capitolul 3 pentru profilul polifenolic al extractelor obținute prin macerare sunt comparate cu datele profilurilor polifenolice obținute prin sonicare. A fost investigată contribuția ultrasunetelor la intensificarea procesului, modul în care noile profiluri influențează activitățile antioxidante și antimicrobiene și calitatea extractelor de propolis.

A treia și a patra parte a tezei conțin concluziile generale ale tezei de doctorat, respectiv elementele de originalitate ale acestei lucrări.

## **Capitolul 1 - Prezentarea obiectului cercetării, a metodelor și a conceptelor utilizate**

### **1.1. Propolisul - principalul produs apicol**

*Propolisul* este o substanță densă și lipicioasă produsă de albine. Acestea colectează rășinile din diverși copaci, cum ar fi plopi, conifere, pruni, le prelucrează prin amestecarea cu ceară, polen și saliva lor, care conține enzime specifice, rezultând în final un produs bogat în proprietăți biologice. Propolisul este folosit de albine pentru a acoperi fisurile din stup, pentru a acoperi corpurile intrușilor și pentru a asigura un mediu aseptice în stup [10].

Pentru această lucrare de cercetare, am folosit propolis brut (produs de *Apis Mellifera* Carpatica), donat de dr. Roxana Spulber (Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Apicultură, București, România), recoltat de apicultori în sezonul martie-noiembrie 2016. Acesta a fost depozitat în laborator la - 20 °C până la procesare și analiză.

#### **1.1.1. Compoziția propolisului și efectele sale asupra sănătății umane**

Propolisul este un produs valoros pentru sănătatea umană datorită efectului sinergic al tuturor constituenților săi, dar multe studii acordă o atenție deosebită polifenolilor [14, 15].

Compușii polifenolici sunt o familie mare de compuși organici naturali cu o mare importanță în sănătatea umană [16]. Aceștia sunt împărțiți în patru clase principale: acizi fenolici (împărțiți în continuare în acizi hidroxicinamici și acizi hidroxibenzoici), flavonoide, stilbeni și lignani.

Cei mai comuni polifenoli care se găsesc în propolisul românesc, dar și în cel european, sunt: *flavonoidele*, precum quercetina, esterul fenetic al acidului cafeic (CAPE), pinocembrina, apigenina, crizina, galangina, acetina, pinostrobinul, miricetina, luteolina, kaempferolul, naringenină, rutină, catehină, epicatehină și *acizi fenolici* precum cafeic, p-cumaric, galic, elagic, siringic, ferulic, cinamic, benzoic, salicilic sau vanilic [20-27].

### **1.2. Metode de extracție a compușilor valoroși din propolis**

#### **1.2.1. Extracția clasică**

În acest capitol au fost descrise, de asemenea, metodele de extracție utilizate pentru obținerea extractelor de propolis, factorii care influențează procesul de extracție și tehnicile utilizate pentru determinarea compoziției propolisului, a capacității antioxidante și a activității antimicrobiene.

Astfel, este descrisă tehnica de macerare, care este o metodă clasică de extracție, ieftină și simplă, care poate fi realizată la temperatura camerei. Compușii cu proprietăți bioactive sunt extrași din diferite plante, derivați de plante și propolis, folosind diferiți solvenți și timpi de extracție diferiți.

Cei mai importanți factori care influențează extracțiile prin macerare ale propolisului, precum și alte tipuri de extracții sunt: natura solventului, timpul de contact între plantă și solvent, temperatura, raportul dintre material și solvent, dimensiunea particulelor materialului supus extracției [56, 57].

### 1.2.3. Extracția asistată de ultrasunete

Extracția asistată de ultrasunete este o tehnică simplă de utilizat, care nu necesită mult timp de extracție sau investiții mari pentru o bună eficiență. De asemenea, ultrasunetele facilitează difuzia solventului în probă și crește migrarea compușilor în lichid, prin dilatarea porilor materialului supus extracției sau prin fisurarea sau ruperea pereților acestuia [73, 74].

Cei mai importanți factori care influențează ultrasunetele sunt: puterea, amplitudinea, frecvența și intensitatea.

## 1.3. Metode analitice pentru cuantificarea acizilor polifenolici și a flavonoidelor din extractele de propolis

### 1.3.1. Metode spectrofotometrice

Testul Folin-Ciocalteu (F-C) este o măsurătoare colorimetrică utilizată pe scară largă în analizele care au ca scop estimarea conținutului total de compuși fenolici din extractele de plante, alimente și alte tipuri de probe [102].

#### *Conținutul total de polifenoli*

Conținutul total de polifenoli din extractele de propolis obținute în această lucrare de cercetare a fost determinat prin reacția cu reactivul Folin-Ciocalteu în mediu bazic, folosind acidul galic ca și compus model. După diluții corespunzătoare, 1 ml de extract diluat a fost amestecat cu 5 ml de reactiv Folin-Ciocalteu, soluție 10 %. Amestecul a fost completat până la 10 ml cu  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , soluție 7,5 %, după 5 minute. Absorbanța la 765 nm a fost măsurată, după 60 min de repaus la întuneric, în celula de cuarț de 1 cm, față de apă [115,148].

#### *Conținutul total de flavonoide*

Conținutul total de flavonoide a fost determinat prin reacție cu  $\text{AlCl}_3$ , după 30 de minute de reacție. Quercetina a fost utilizată ca și compus model. În mod obișnuit, 0,5 ml de standard și 1,5 ml de soluție de  $\text{AlCl}_3$  2 % în etanol au fost completate până la 5 ml cu etanol. Absorbanța la 452 nm a fost măsurată într-o celulă de cuarț de 10 mm, față de etanol [115, 148].

#### *Substanțe chimice și echipamente utilizate în prezenta cercetare*

Etanol (99,8 %), reactiv Folin-Ciocalteu (2 M, 1,27 g/mL), 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), acid galic (standard ACS, 95,5 %),  $\text{AlCl}_3$  (99,99 %), quercetină (95 %), Trolox (95%), acidul 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic - ABTS - (98%),  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (99%),  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{H}_2\text{O}$  (99,8%) au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich (Germania). Extracțiile au fost efectuate într-un agitator orbital ES 80- Grant Instruments.

Pentru cântărire s-a utilizat o balanță analitică Kern 770 (Germania), cu o precizie de cântărire de 0,0001 g. Toate soluțiile au fost preparate în sticlărie de laborator de clasa A. Apa a fost purificată cu ajutorul unui sistem de demineralizare TKA (Germania), atingând o conductivitate de  $18,2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$ . Un spectrofotometru monofasciculat Varian Cary 50 UV-Vis (SUA) a fost utilizat pentru a măsura absorbanțele probelor [87, 115, 148].

### 1.3.2. Tehnici cromatografice

Sistemul UHPLC cuplat cu spectrometru de masă (UHPLC-MS) este cel mai sensibil și eficient echipament, utilizat în laboratoarele specializate pentru separarea și identificarea noilor compuși, în special a celor organici, oferind mult mai multe informații structurale decât metodele de analiză convenționale [109].

În studiul de față [87, 148], derivații polifenolici au fost cuantificați prin UHPLC-MS. Acizii fenolici și flavonoidele au fost cuantificați cu un sistem UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific), cuplat cu un spectrometru de masă Q Exactive Focus Hybrid Quadrupole-Orbitrap echipat cu o sondă HESI (Heated Electrospray Ionisation) (Thermo Fisher Scientific). Coloana Kinetex C18 (Fusion-RP, 100 Å, coloană LC 100 × 2,1 mm, diametrul particulelor 1,7 μm) a funcționat la 30 °C. Volumul de injecție a fost de 10 μL, fiecare injecție fiind repetată de trei ori. Faza mobilă A a conținut acid formic, soluție apoasă de 0,1 %, în timp ce soluția B a fost o soluție metanolică de acid formic de 0,1 %. Programul de eluție în gradient a început cu 100% A: 0-2 min, de la 100% A la 98% A, 2% B la 400 μL/min; 2-5 min, de la 98% A, 2% B la 50% A, 50% B la 300 μL/min; 5-17 min, de la 50% A, 50% B la 2% A, 98% B la 300 μL/min; 17-18 min, de la 2% A, 98% B la 98% A, 2% B la 400 μL/min; 18-20 min la 100% A. Spectrometrii de masă au fost înregistrați în modul de ionizare negativă, iar azotul a fost utilizat ca gaz de coliziune, gaz de înveliș și gaz auxiliar la debite de 11-48 de unități arbitrare. Tensiunea de pulverizare a fost de 2,5 kV, iar temperatura capilară de 320 °C. Datele au fost achiziționate și analizate cu ajutorul pachetului software Thermo Xcalibur (versiunea 4.1). S-au efectuat calibrări în intervalul de concentrație 50-1750 μg/L, prin diluția în serie a amestecului standard metanolic de 10 mg/L. Extractele de propolis au fost filtrate printr-o membrană de politetrafluoretilenă de 0,45 μm și diluate înainte de a fi injectate în sistemul UHPLC-MS [87, 148].

Standarde analitice pentru flavonoide [apigenină, (+)-catehină, crisină, (-)-epi-catehină, galangină, hesperidină, izorhamnetină, kaempferol, pinocembrină, quercetină, rutină] și acizi fenolici (acid cafeic, 3,4-dihidroxibenzoic, t-ferulic, galic, 4-hidroxibenzoic, p-coumaric, siringic și vanilic), derivați ai acizilor fenolici (CAPE, elagic și clorogenic), stilbeni (acidul t-resveratrol), acidul vanilic) și terpene (acidul abscisic) de la Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania) au fost utilizați pentru a pregăti stocuri metanolice de 500 mg/L [87, 148].

#### **1.4. Metode de evaluare a activității antioxidante și antimicrobiene**

Metoda spectrofotometrică de determinare a activității antioxidante prin metoda cation-radical ABTS se bazează pe reacția dintre dianionul 2,2'-azinobis-(acidul 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) și persulfatul de potasiu, ceea ce duce la formarea cromoforului albastru-verde stabil ABTS•, care dobândește o sarcină pozitivă și devine un cation [118].

DPPH este o metodă simplă, ieftină și utilizată pe scară largă pentru a evalua capacitatea compușilor de a dona atomi de H sau de a capta radicalii liberi [128].

##### *Capacitate antioxidantă*

Extractele au fost testate pentru capacitatea antioxidantă prin absorbția radicalilor liberi cu durată lungă de viață ABTS•+ și DPPH, Trolox fiind un compus model. Testul ABTS a fost efectuat la 734 nm, față de un martor reactiv în apă, în timp ce testul DPPH a fost efectuat la 515 nm.

Extractele de propolis au fost diluate înainte de a reacționa cu soluția de radicali liberi. Capacitatea antioxidantă a fost calculată, indiferent de metoda utilizată, ca concentrație echivalentă de Trolox din curbele de calibrare, și anume capacitatea antioxidantă echivalentă de Trolox (TEAC), și a fost raportată ca μg TEAC/mL [87,115,148].



## **1.5. Instrumente matematice pentru prelucrarea avansată a datelor**

### **1.5.1. Instrumente de statistică descriptivă pentru tratamentul primar al datelor experimentale**

#### **1.5.2. Instrumente statistice multivariate**

Statisticile descriptive au fost utilizate pentru a evalua erorile experimentale pentru măsurătorile chimice și microbiologice. Reprezentările grafice ale concentrației de componente obținute în extractele de propolis la diferite rapoarte lichid/solid, atât la macerare, cât și la expunerea în câmp cu ultrasunete, au oferit o bună perspectivă pentru evaluarea procesului și estimarea erorilor experimentale. Erorile experimentale au fost clar reprezentate în tabelele de date și în graficele din toate lucrările publicate.

Analiza multivariată (AM) poate extrage cât mai multe informații utile din date, luând în considerare toate variabilele în același timp. AM utilizează metode statistico-matematice care pot investiga simultan relațiile dintre trei sau mai multe variabile.

##### **1.5.2.1. Analiza componentelor principale**

PCA (Analiza Componentelor Principale) este cea mai veche metodă chemometrică de analiză multivariată care utilizează calcule statistice matematice pentru a interpreta datele. Această metodă se bazează pe extragerea celui mai mic număr de componente care conține cât mai multe informații din datele originale ale sistemului studiat.

O matrice de date  $\{n \times m\}$ ,  $X$ , constă în  $n$  eșantioane sau obiecte în spațiul a  $m$  variabile măsurate. Ideea principală a PCA este de a găsi  $m$  PC ( $PC_1, PC_2, \dots, PC_m$ ) care sunt obținute prin combinații liniare ale variabilelor originale care descriu fiecare eșantion ( $X_1, X_2, \dots, X_m$ ).

Deci:

$$PC_1 = a_{11}X_1 + a_{12}X_2 + a_{13}X_3 + \dots + a_{1m}X_m$$

$$PC_2 = a_{21}X_1 + a_{22}X_2 + a_{23}X_3 + \dots + a_{2m}X_m \quad (4)$$

...

$$PC_m = a_{m1}X_1 + a_{m2}X_2 + a_{m3}X_3 + \dots + a_{mm}X_m$$

##### **1.5.2.2. Analiza discriminantă liniară**

LDA, ca și PCA, este o metodă statistică de selectare a caracteristicilor și de reducere a dimensiunii datelor inițiale, păstrând în același timp o mare parte din informațiile discriminante.

Scopul LDA este de a clasifica obiectele în două sau mai multe grupe pe baza unui set de  $n$  caracteristici care descriu obiectele, încercând să găsească cea mai bună direcție de proiecție a datelor în care vectorii diferitelor clase sunt cel mai bine separați.

##### **1.5.2.3. Regresia prin metoda celor mai mici pătrate parțiale**

Metoda PLS urmărește să analizeze relațiile dintre o serie de variabile independente ( $X$ ) și o serie ( $Y$ ) sau un vector ( $y$ ) de variabile dependente, numit răspuns. Practic, este o

combinație între PCA și regresie și se aplică atunci când numărul de variabile independente este mai mare decât numărul de seturi de date.

PLS stabilește un nou set de variabile, numite variabile latente (LVs), cu rol în maximizarea covarianței dintre matricile X și Y, astfel, PLS extrage acele variabile care separă informația din matricea X de zgomot și se obține un model de calibrare, descris de ecuația:

$$Y = XB + E \quad (15)$$

- B este matricea coeficienților de regresie PLS.

## Capitolul 2 - Extracte de propolis românesc: caracterizare și analiză și modelare statistică <sup>[115]</sup>

### 2.2. Probele de propolis

Propolisul congelat a fost cântărit și măcinat, iar distribuția dimensiunii particulelor a fost măsurată cu ajutorul unui set de sită Retsch AS 200. Toate fracțiunile rezultate au fost grupate în funcție de dimensiunea particulelor în fracțiuni de particule fine ( $d < 600 \mu\text{m}$ ), medii ( $600 \mu\text{m} < d < 1,25 \text{ mm}$ ) și mari ( $d > 1,25 \text{ mm}$ ).

### 2.8 Analiza statistică și modelarea

Analiza statistică multivariată a datelor spectrale a fost efectuată utilizând analiza componentelor principale (PCA) și analiza discriminantă liniară (LDA) pentru analiza a 300 de seturi de date (spectre în intervalul 200-500 nm).

### 3. Rezultate și discuții

Efectele modificării parametrilor de funcționare au fost monitorizate în ceea ce privește conținutul total de polifenoli și flavonoide, capacitatea antioxidantă în prezența ABTS și caracteristicile spectrale în domeniul 200 - 900 nm.

Niveluri mai mari de compuși polifenolici și flavonoide, împreună cu capacități antioxidante mai mari au fost înregistrate pentru extractele etanolicе, comparativ cu nivelurile corespunzătoare din extractele apoase.

Se așteaptă ca extracția polifenolilor și a flavonoidelor să tindă spre concentrații de saturație în timp, prin urmare, datele experimentale pentru toate cele trei clase granulometrice la diferite durate de extracție au fost corelate folosind modelul de saturație general acceptat:

$$C(\tau) = C_{\max} \cdot \frac{\tau}{K + \tau} \quad (4)$$

unde  $C(\tau)$  este concentrația din extract la momentul  $\tau$ ,  $C_{\max}$  concentrația maximă care poate fi atinsă în condițiile experimentale date, iar K constanta cinetică de extracție.

În tabelul 1 sunt prezentate rezultatele, cu Err reprezentând eroarea relativă absolută între valorile experimentale și cele calculate.

Table 1

Solid – liquid extraction parameters						
Parameter	Polyphenols					
	Ethanolic extracts			Water extracts		
	Small particles	Medium particles	Large particles	Small particles	Medium particles	Large particles
$C_{max}$ , mg/g	92.7	90.1	89.7	15.1	6.80	Inadequate model
$K$ , d	0.25	0.11	0.32	1.68	0.68	
Err, %	5.1	5.4	2.8	27	17	
Parameter	Flavonoids					
	Ethanolic extracts			Water extracts		
	Small particles	Medium particles	Large particles	Small particles	Medium particles	Large particles
$C_{max}$ , mg/g	3.09	4.099	4.156	0.317	0.33	0.167
$K$ , d	0.049	0.32	1.105	14.77	14.75	14.98
Err, %	3.00	12.6	17.5	26.2	27.6	37.13

Fig. 1 prezintă predicțiile modelului estimat pentru extractele etanolice în ceea ce privește polifenolii și flavonoidele extrase totale.

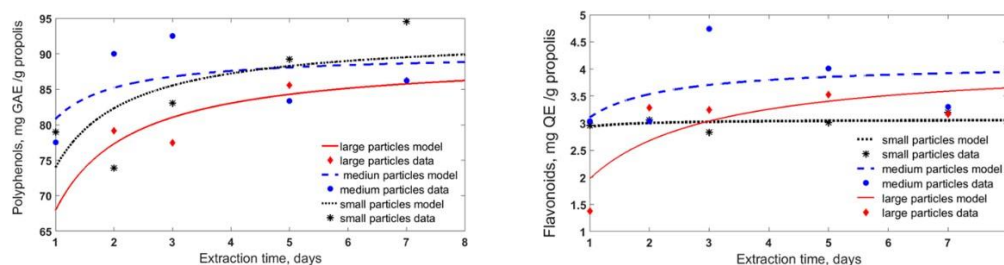


Fig. 1. Polifenoli și flavonoide în extractele etanolice în conformitate cu modelul cinetic de saturare

Așa cum era de așteptat, creșterea capacității antioxidante pentru probele corespunzătoare unei durate de extracție mai mari urmează o tendință de limitare în timp, deoarece această proprietate se datorează în principal polifenolilor și flavonoidelor prezente în extract (Fig. 2).

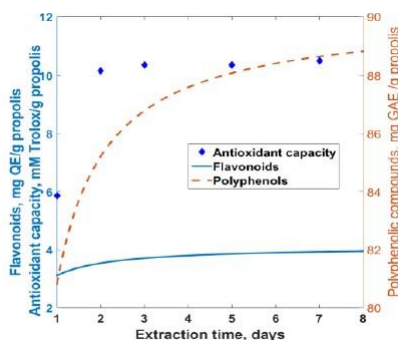


Fig. 2. Evoluția în timp a capacității antioxidante în extractele etanolice de particule de propolis de mărime medie

Studiul spectral concentrat în intervalul 200 - 500 nm este reprezentat în (Fig. 3). Se pot observa diferențe în timp și în funcție de mărimea particulelor. Extractele apoase au prezentat două benzi suprapuse de intensități diferite, centrate la 320 și 280 nm, împreună cu un umăr în regiunea 220 - 230 nm. Extractele obținute de particulele mari și mici au prezentat doar modificări hipercromice în timp (Fig. 3a).

Extracțiile de particule de mărime medie prezintă modificări spectrale neașteptate în domeniul 280 - 300 nm, cu cel puțin două puncte izosbestice vizibile (Fig. 3b). Mediul de extracție 1:1 apă:etanol conduce la caracteristici spectrale diferite (Fig. 3c).

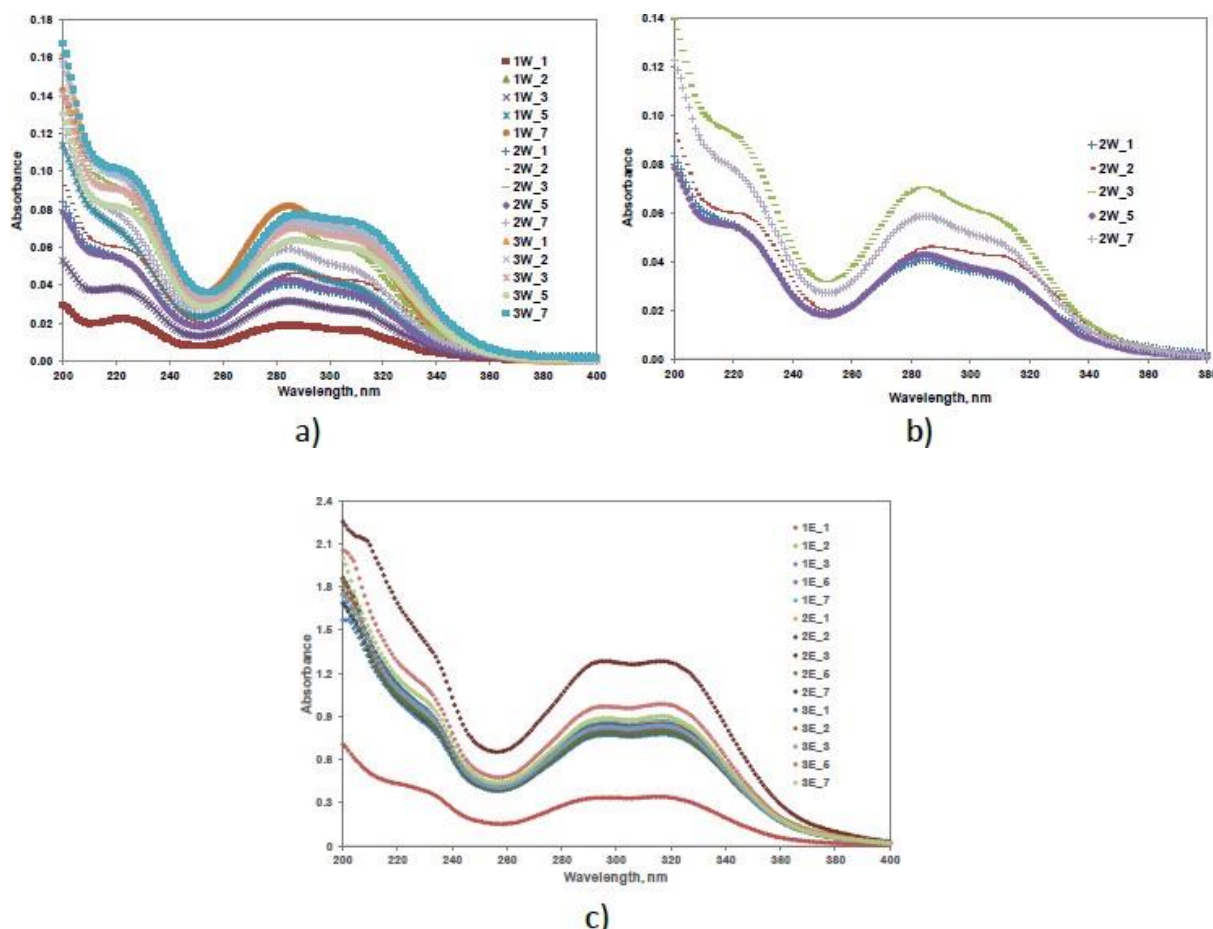


Fig. 3. Detalii spectrale pentru extractele obținute prin prelucrarea particulelor de propolis de diferite dimensiuni în timp (1 - 7 zile): a) extracte apoase din particule mari (1W), medii (2W) și mici (3W); b) extracte în amestec 1:1 etanol:apă din particule mari (1W), medii (2W) și mici (3W); c) particule medii în fază apoasă

PCA aplicată la acest spectru de absorbție al tuturor extractelor în domeniul 200 - 500 nm (300 de lungimi de undă) a arătat că primele 7 PC reflectă peste 99,9 % din variabilitatea datelor. În spațiul PC1 - PC2 (Fig. 4), extractele apoase și etanolice formează două clase diferite, dar probele apoase sunt mai puțin diferențiate prin caracteristicile granulometrice decât extractele etanol-apă, unde dimensiunea particulelor de propolis pare să influențeze proprietățile extractului reflectate de spectrele de absorbție.

LDA a fost efectuată utilizând primele 7 PC pentru caracterizarea probelor. Aceasta a oferit o separare mai clară a probelor în ceea ce privește solventul de extracție și fracția granulometrică utilizată (Fig. 5). Principala diferențiere este pe LDA1, dovedind că utilizarea soluțiilor apoase față de soluțiile etanolice poate duce la proprietăți diferite ale extractului. Cele trei clase granulometrice utilizate pentru extracția etanolică apar ca grupuri separate, în principal pe direcția funcției LDA2, dovedind că granulația propolisului este un factor susceptibil să influențeze conținutul extractului, așa cum se arată și în Fig. 1-2.

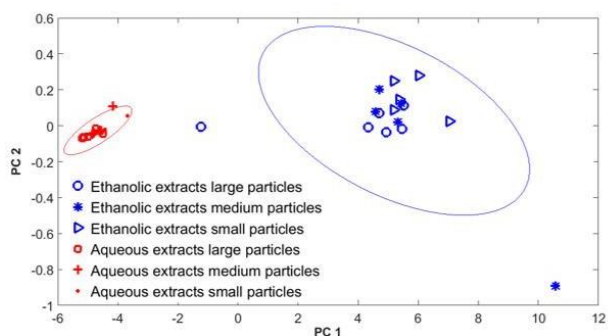


Fig. 4. Extracte apoase și etanolice reprezentate în coordonate PC1-PC2

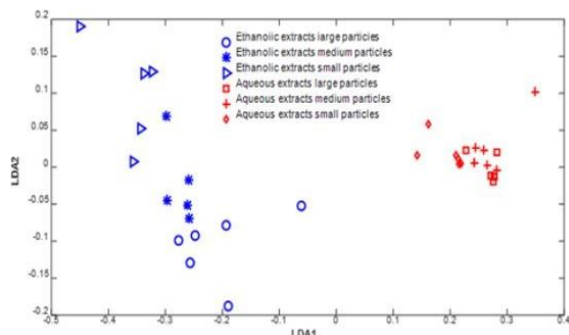


Fig. 5. Reprezentarea eșantioanelor în coordonatele funcțiilor LDA

Analiza de regresie prin PLS a fost efectuată separat pentru extractele etanolice și apoase pentru principalele proprietăți măsurate: polifenoli, flavonoide și capacitate antioxidantă. A fost utilizat numărul minim de PC-uri, care reflectă peste 95% din variabilitatea datelor.

Table 2

**Results of the PLS regression analysis**

Property	Ethanollic extracts				Aqueous extracts			
	PCs	R <sup>2</sup>	Training error, %	Testing error, %	PCs	R <sup>2</sup>	Training error, %	Testing error, %
Polyphenols	6	0.992	1.53	6.50	4	0.995	3.17	15.8
Flavonoids	6	0.993	1.48	8.62	5	0.993	5.08	14.2
Antioxidant capacity	7	0.978	2.00	6.64	6	0.997	0.99	12.0

Rezultatele corelației și importanța relativă a variabilelor inițiale (lungimile de undă) în alcătuirea modelului de regresie sunt prezentate în figurile 6 și 7.

Figurile 6b și 7b arată că principala contribuție la stabilirea unei corelații între datele spectrale și conținutul de polifenoli este reprezentată de lungimile de undă în jurul valorii de 220 nm, 250 nm și 320 nm.

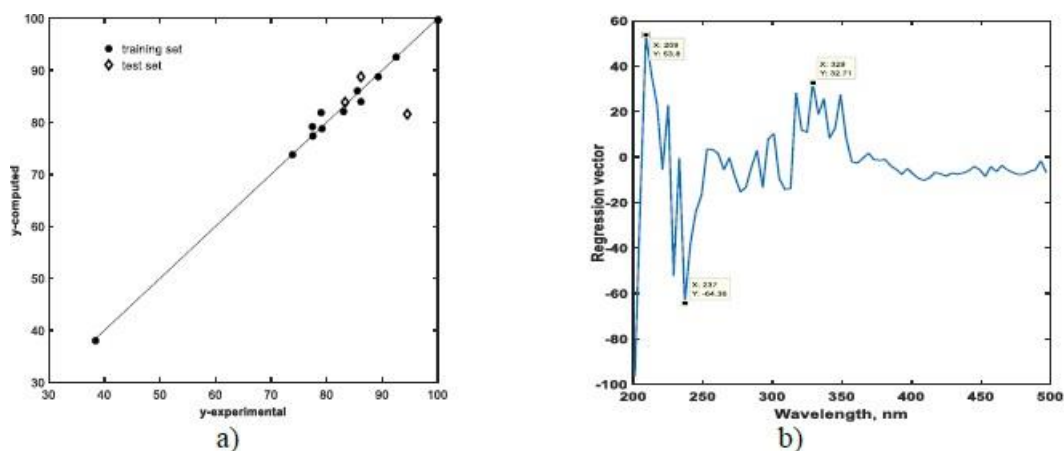


Fig. 6. Rezultatele corelației PLS a polifenolilor pentru extractele etanolice a) date de corelație, b) importanța relativă a lungimilor de undă în modelul de corelație

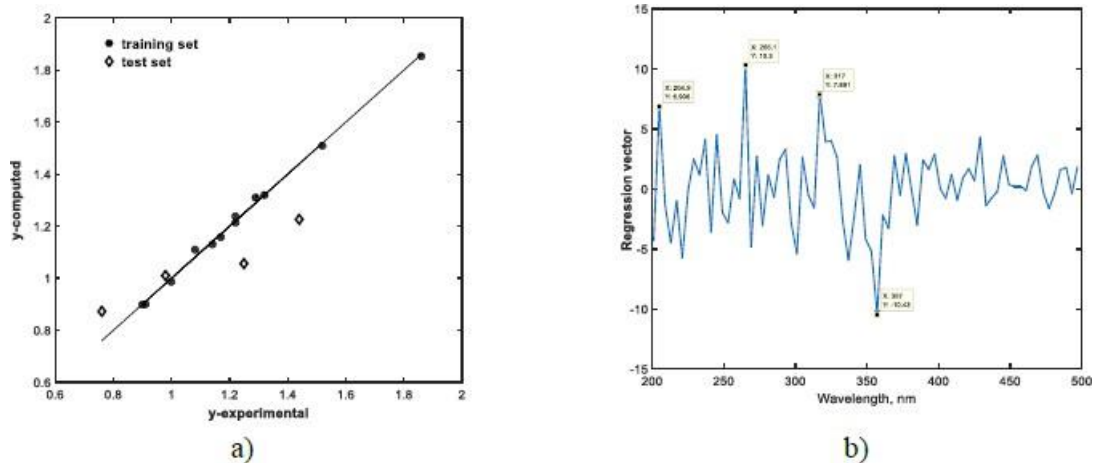


Fig. 7. Rezultatele corelației PLS a polifenolilor pentru extractele apoase a) date de corelație, b) importanța relativă a lungimilor de undă în modelul de corelație a polifenolilor

### Capitolul 3 - Efecte ale profilului polifenolic asupra activității antioxidante și antimicrobiene a extractelor de propolis <sup>[148]</sup>

#### Proceduri de extracție

Pentru extracție s-au folosit soluții de apă și etanol (25%, 50%, 70% g/g). Rapoartele lichid:solid (g/g) au fost de 2:1, 4:1 și 6:1. Fazele au fost puse în contact la temperatura camerei, la 150 rpm timp de 1, 3 și 5 zile, într-un agitator orbital ES 80-Grant Instruments (UK). Extractele au fost separate de ceară cu hârtie de filtru Filtrak nr. 389, Ø 12,5 cm, și au fost păstrate la - 20 °C până la analiză. Sistemul de codificare a extractelor este o combinație alfa-numerică în care litera reprezintă solvențul (A- apă, E-25%, EE-50%, EEE-70% etanol), prima cifră, raportul lichid:solid (2:1, 4:1 și 6:1), în timp ce a doua cifră reprezintă durata de contact (1 pentru 24 h, 3 pentru 72 h, 5 pentru 120 h).

#### Rezultate și discuții

În cele 36 de extracte de propolis preparate și analizate, au fost cuantificați 21 de derivați polifenolici.

Datele colectate, cu abateri standard relative sub 5%, au identificat principii bioactive cu un conținut mediu mai mic de 100 μg/g, sub 1 mg/g și un grup majoritar care depășește 1 mg/g.

Acizii fenolici reprezintă în medie 98,5% din compușii extrași în apă și sunt însoțiți de 1,45% flavonoide și 0,05% acid abscisic, singurul terpenoid identificat în acest studiu. În soluțiile hidroalcoolice de 25%, acizii fenolici depășesc 86%. În 50% etanol, aceștia reprezintă mai puțin de 44% din total, scăzând la 40% în 70% etanol.

Cel mai bine extras compus în apă este acidul p-cumaric (1,73 mg/g), în timp ce în etanol 25% este acidul ferulic (1,5 mg/g) (Fig. S3 și S4). Tendința este mai puțin clară în cazul etanolului de 50%, în timp ce etanolul de 70% extrage cel mai mult crizina în toate testele (Fig. 2. și Fig. S5).



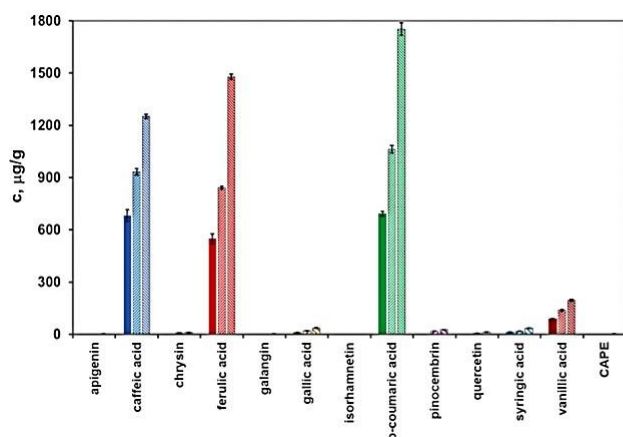


Figura S3. Model de compoziție a polifenolilor la diferite rapoarte lichid : solid în apă (A25 - culoare întregă, A45 - dungi diagonale în sus și A65 - dungi diagonale în jos).

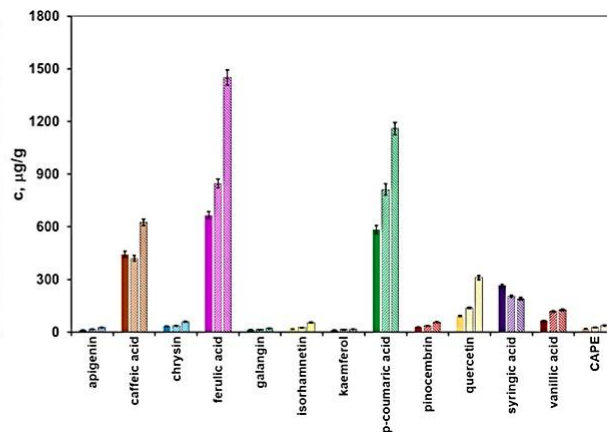


Figura S4. Model de compoziție a polifenolilor la diferite rapoarte lichid : solid în etanol 25 % (E25 - culoare plină, E45 - dungi diagonale în sus și E65 - dungi diagonale în jos).

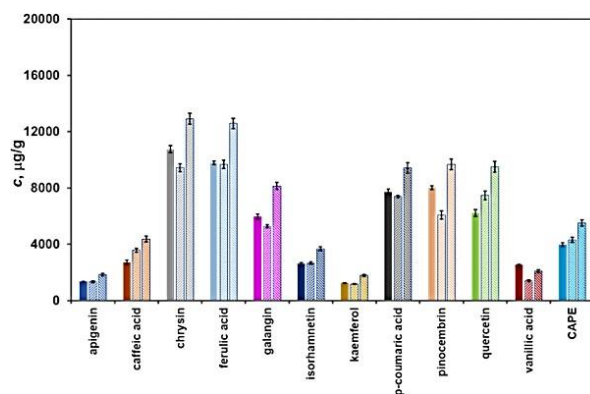


Figura 2. Model de compoziție a derivaților polifenolici la diferite rapoarte lichid : solid în etanol 50% (EE25 - culoare întregă, EE45 - dungi diagonale în sus și EE65 - dungi diagonale în jos).

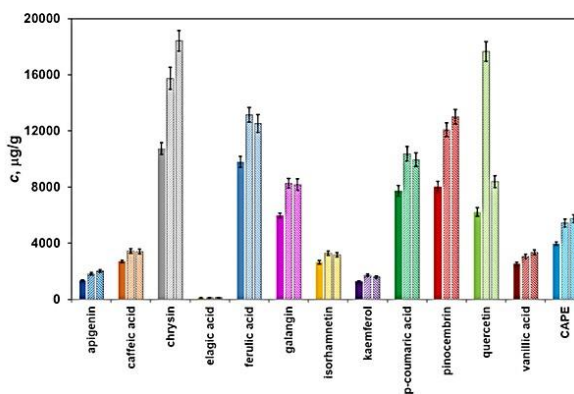


Figura S5. Modelul compoziției polifenolice la diferite rapoarte lichid : solid în etanol 70 % (EEE25 - culoare plină, EEE45 - dungi diagonale în sus și EEE65 - dungi diagonale în jos)

## Variația efectelor antioxidante

Efectele antioxidante înregistrate în solvenți de tip apos, determinate prin stingerea ABTS, sunt induse de acizi și de esterii acestora, deoarece flavonoidele sunt prezente în cantități neglijabile (fig. 3).

Volumele mai mari de alcool oferă premisele de a extrage mai multe flavonoide, alături de cantități mai mari de anumiți acizi fenolici. Creșterea mare a efectelor antioxidante este atribuită flavonoidelor (Fig. 3b).

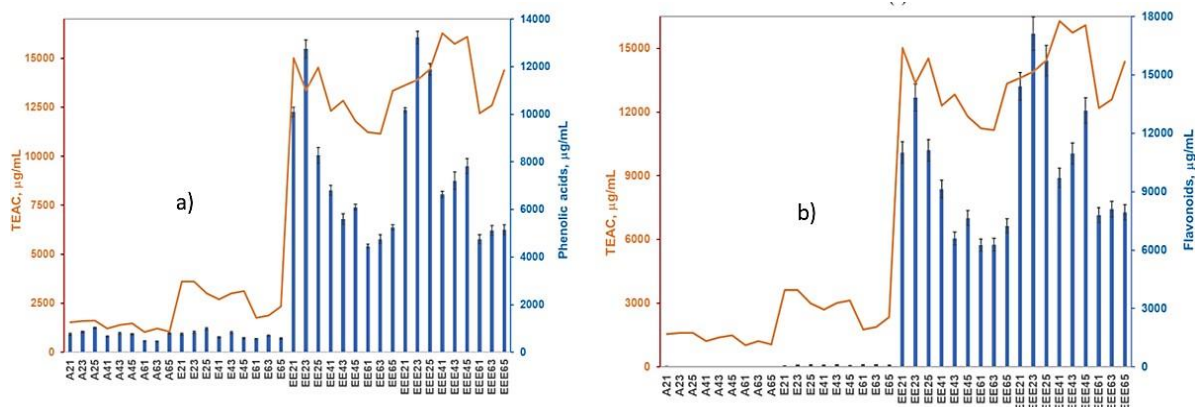


Figura 3. Variația efectelor antioxidante (testul ABTS) în funcție de distribuția acizilor fenolici (a) și a flavonoidelor (b).

**Modelarea statistică** a fost aplicată pentru a investiga corelația dintre conținutul de polifenoli al extractelor și capacitatea antioxidantă. S-a utilizat un model de tip saturație (Ecuția 1) pentru a afla dacă există o concentrație limită de acizi polifenolici și flavonoide,  $c_p$ , pentru care capacitatea antioxidantă,  $Q_a$ , atinge saturația:

$$Q_a = \frac{K_{\max} \cdot c_p}{K_c + c_p} \quad (1)$$

unde  $Q_a$  este capacitatea antioxidantă (TEAC,  $\mu\text{g/mL}$ ),  $c_p$  este concentrația de derivați polifenolici ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Parametrii modelului sunt  $K_{\max}$ , ( $\mu\text{g Trolox/mL}$ ), potențialul antioxidant al extractului la valori  $c_p$  teoretic foarte ridicate ( $c_p \rightarrow a$ ), și  $K_c$  ( $\mu\text{g/mL}$ ), concentrația critică ( $c_p$  pentru care  $Q_a$  este jumătate din  $K_{\max}$ ). Parametrii modelului au fost identificați minimizând funcția obiectiv (2):

$$F = \sum_{i=1}^n (Q_{a,\text{exp}} - Q_{a,\text{model}})^2 \quad (2)$$

unde  $n$  este numărul de eșantioane luate în considerare.

S-a efectuat regresia modelului de saturație față de datele experimentale pentru corelarea concentrației de compuși chimici identificați în fiecare solvent de extracție cu capacitatea antioxidantă corespunzătoare a extractului (Fig. 6).

Coeficientul de determinare,  $R^2$ , este de 0,96 pentru  $K_{\max} = 18,216 \mu\text{g TEAC/mL}$  extract și  $K_c = 5632 \mu\text{g derivați polifenolici/mL}$  extract. Deoarece capacitatea antioxidantă maximă înregistrată experimental este de  $16,287 \mu\text{g TEAC/mL}$  extract, valoarea  $K_{\max}$  arată o posibilă creștere a capacității antioxidante prin creșterea conținutului de derivați polifenolici din extracte.



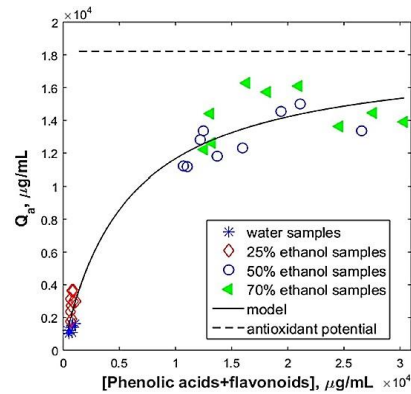


Figura 6. Capacitatea antioxidantă în funcție de conținutul total de derivați polifenolici din probe.

Capacitatea antioxidantă crește odată cu creșterea concentrației totale de fenoli, cu o creștere abruptă în zona de 25-50% etanol.

Panta modelului scade drastic în cazul etanolului de 50-70%, reflectând valorile experimentale (valori care oscilează în jurul a 15 000  $\mu\text{g TEAC/mL}$ ). Conform acestui model, creșterea peste 50% a conținutului de etanol în extractant nu aduce modificări importante în ceea ce privește capacitatea antioxidantă.

Analiza statistică a corelat, de asemenea, concentrația individuală de polifenoli din extracte cu capacitatea antioxidantă corespunzătoare. Prin urmare, legătura dintre capacitatea antioxidantă și compoziția polifenolică, identifică compușii chimici implicați sinergic în capacitatea antioxidantă (figurile S6-S9).

Corelarea datelor a fost realizată prin metoda celor mai mici pătrate parțiale (PLS), o combinație de analiză a componentelor principale (PCA) și regresie.

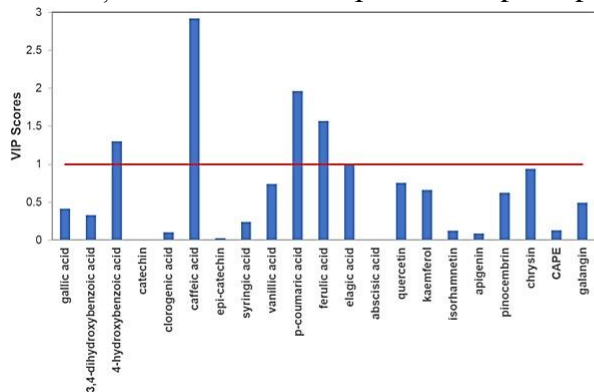


Figure S6. Chemical components with important contribution in the PLS model (VIP scores >1) for water extracts.

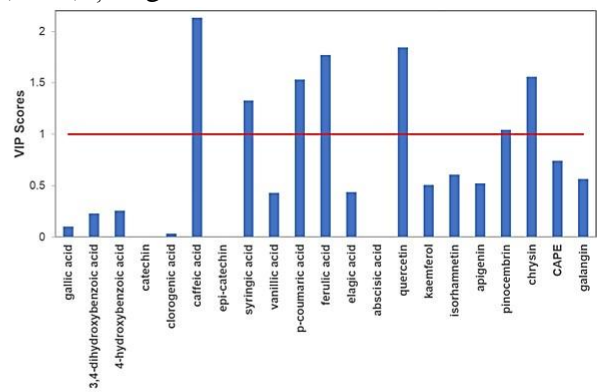


Figure S7. Chemical components with important contribution in the PLS model (VIP scores >1) for 25% ethanolic extracts

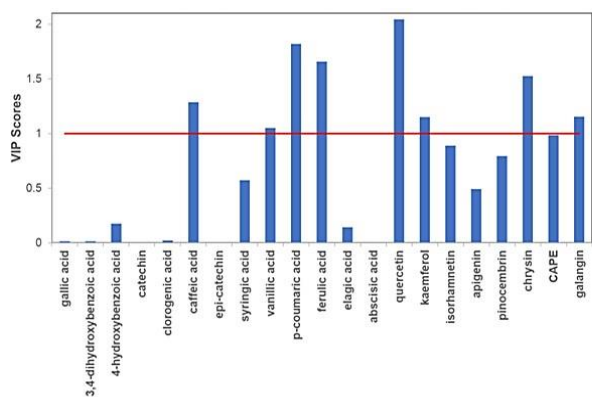


Figure S8. Chemical components with important contribution in the PLS model (VIP scores >1) for 50% ethanolic extracts

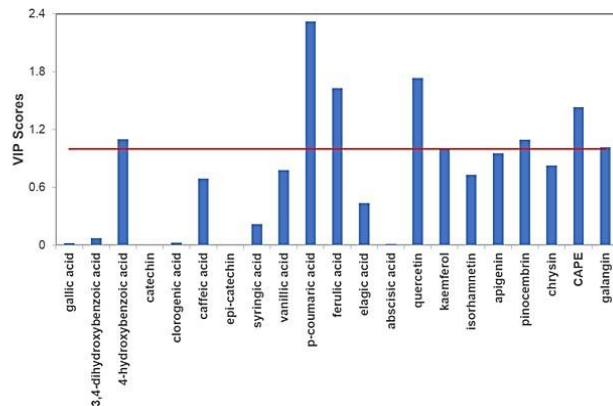


Figure S9. Chemical components with important contribution in the PLS model (VIP scores >1) 70% ethanolic extracts.

Aceste componente au inclus, în ordine descrescătoare, variabilitatea dintre probe în ceea ce privește compoziția polifenolică și capacitatea antioxidantă. Pentru a identifica principiile bioactive care influențează semnificativ variația capacității antioxidante s-a utilizat "influența variabilă asupra proiecției", cunoscută sub denumirea de "VIP".

Un scor VIP rezumă contribuția fiecărei variabile la modelul de regresie. Variabilele cu valori VIP mai mari de 1 sunt, în general, considerate relevante. Scorul VIP, definit pentru fiecare variabilă (principiu bioactiv extras), a fost calculat ca o sumă a încărcărilor componentelor PLS ale acesteia, ponderată cu procentul de varianță Y explicată de fiecare componentă PLS.

### Cuantificarea activității antimicrobiene

Tabelul 2 prezintă activitatea antimicrobiană a extractelor de propolis studiate. Extractele apoase de propolis prezintă o activitate bactericidă constantă și substanțială împotriva G -, dar nu atât de ridicată împotriva G +.

Extractele apoase, care conțin în principal acizi fenolici, s-au dovedit a acționa asupra *E. coli* și *C. Albicans*. Extractul cu cel mai bun efect antibacterian asupra *E. coli* este A65, cu un raport lichid:solid mai mare.

Extractele etanolicе în proporție de 50% conțin, pe lângă acizi fenolici, cantități mari de crisină și galangină, flavonoide cu un aport antioxidant deja dovedit.

Nivelurile ridicate de flavonoide par a fi responsabile pentru reacția mai bună față de *B. subtilis*. Extractele etanolicе 50% au prezentat cea mai mică concentrație inhibitoare pentru G - după 5 zile, 768,5 μg/mL.

O cantitate mai mare de etanol în solventul de extracție (70%) nu aduce o creștere suplimentară, nici a activității antimicrobiene, nici a celei antifungice.

Extract	<i>E. coli</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>C. albicans</i>	
	Inhibition zone, mm	MIC, µg/mL	Inhibition zone, mm	MIC, µg/mL	Inhibition zone, mm	MIC, µg/mL
A21	0.50 <sup>a</sup>	< 1663	1.00 <sup>a</sup>	4990	1.33 ± 0.47	< 832
A41	1.00 <sup>a</sup>		na		2.33 ± 0.94	
A61	2.00 <sup>a</sup>		na		2.67 ± 0.47	
A23	0.50 <sup>a</sup>	< 832	0.67 ± 0.24	2495	1.00 ± 0.82	< 832
A43	1.00 <sup>a</sup>		0.50 <sup>a</sup>		2.00 ± 0.82	
A63	2.33 ± 0.47		na		1.33 ± 0.47	
A25	na	< 832	0.50 <sup>a</sup>	< 1633	2.01	< 832
A45	1.00 <sup>a</sup>		0.50 <sup>a</sup>		2.00 ± 1.00	
A65	2.67 ± 0.47		0.508		2.67 ± 0.47	
E21	na	1610	1.67 ± 0.47	< 805	na	1610
E41	na		2.00 <sup>a</sup>		na	
E61	1.33 ± 0.7		2.00 <sup>a</sup>		1.67 ± 0.47	
E23	na	1610	1.33 ± 0.47	< 805	na	2415
E43	na		2.00 <sup>a</sup>		0.33 ± 0.12	
E63	1.67 ± 0.47		2.67 ± 0.47		na	
E25	na	1610	na	1208	1.00 ± 0.94	805
E45	na		2.67 ± 0.47		na	
E65	1.00 <sup>a</sup>		na		0.83 ± 0.5	
EE21	1.00 <sup>a</sup>	< 1537	2.00	< 768.5	na	2305
EE41	1.00 <sup>a</sup>		4.67 ± 0.47		1.00 <sup>a</sup>	
EE61	1.33 ± 0.47		4.33 ± 0.47		1.00 <sup>a</sup>	
EE23	1.00 ± 0.41	< 1537	3.67 ± 1.25	< 769	0.67 ± 0.14	769
EE43	1.00 <sup>a</sup>		1.67 ± 0.47		1.33 ± 0.47	
EE63	1.67 ± 0.47		2.33 ± 1.25		1.33 ± 0.47	
EE25	na	< 769	2.33 ± 1.25	< 76	na	1153
EE45	2.00 <sup>a</sup>		4.00 <sup>a</sup>		1.67 ± 1.25	
EE65	1.33 ± 0.47		3.00 ± 0.82		na	
EEE21	0.06 <sup>a</sup>	< 1440	0.33 ± 0.27	< 720	na	1440
EEE41	1.94 ± 0.63		2.78 ± 1.16		na	
EEE61	1.61 ± 0.68		3.22 ± 0.16		0.33 ± 0.02	
EEE23	na	< 720	2.00 ± 0.47	< 720	na	1080
EEE43	1.72 ± 0.72		4.67 ± 0.47		1.00 ± 0.16	
EEE63	3.39 ± 0.47		3.78 ± 0.42		1.22 ± 0.31	
EEE25	na	1080	1.56 ± 0.31	< 720	na	< 2160
EEE45	1.50 ± 0.54		3.33 ± 0.98		0.89 ± 0.16	
EEE65	1.83 ± 0.57		2.22 ± 0.16		0.78 ± 0.16	

**Tabelul 2.** Activitatea antimicrobiană a extractelor de propolis. *n.a.* neactiv (nu sunt raportate suprafețe de inhibiție),<sup>a</sup> replici identice. *E. coli* (Escherichia coli), *B. subtilis* (Bacillus subtilis spizenii nakamura), *C. albicans* (Candida albicans).

## Capitolul 4 - Efectele câmpului ultrasonic asupra profilului polifenolic al extractelor de propolis îmbunătățesc activitatea lor antioxidantă și antimicrobiană? [87]

### Procedura EAU

S-au avut în vedere trei tipuri de solvenți (apă, etanol 25 % și etanol 50 %), trei rapoarte lichid:solid (2:1; 4:1; 6:1) și cinci timpi de extracție (10, 20, 30, 40 și 100 min). Câte 5 g de propolis au fost adăugate în borcane de sticlă peste care s-au adăugat 10 g de solvent pentru raportul 2:1, 20 g de solvent pentru raportul 4:1 și 30 g pentru ultimul raport. Borcanele au fost închise ermetic cu capace și toate probele au fost plasate în perechi în baia cu ultrasunete pentru extracție, întotdeauna la aceeași înălțime deasupra transductoarelor. Borcanele pentru timpii de expunere de 100 min și 10 min au fost plasate mai întâi pentru fiecare raport lichid: solid, ultimul fiind înlocuit, la momentul potrivit, cu borcanele pentru timp de extracție de 20, 30 și 40 de minute. Probele au fost filtrate prin hârtie de filtru în recipiente de plastic sterile cu capac și depozitate în congelator (-20 °C) până la efectuarea analizelor. Frecvența băii cu ultrasunete a fost de 40 kHz (Elma Transsonic, Germania), puterea ultrasonică a fost setată la 110 W (100 %), iar temperatura apei (fluidul de cuplare) a fost menținută în jurul temperaturii ambiante a camerei, înlocuindu-se la fiecare 10 minute de sonicare. Volumul de apă din baia cu ultrasunete a fost întotdeauna același, 1300 ml.

### Prelucrarea datelor

PCA, PLS și regresia neliniară asupra datelor experimentale pentru a evalua parametrii modelului de saturație au fost efectuate cu ajutorul unui software intern scris în mediul de programare Matlab® R2022a (MathWorks, Natick, MA, SUA). Topologia câmpului US a fost calculată

Fizica acustică din COMSOL Multiphysics® 5.2a (COMSOL, Inc., Burlington, MA, SUA).

### Rezultate și discuții

#### Compoziția extractelor

Datele din tabelul 1 demonstrează că nici măcar cel mai lung timp de extracție (100 de minute) petrecut într-o baie cu ultrasunete nu a dus la mult dorita îmbunătățire a extracțiilor apoase în comparație cu macerarea. Principalul câștig, în afară de reducerea timpului de operare, a fost prezența a aproximativ 10 % flavonoide într-un solvent care, în mod normal, solubilizează foarte greu astfel de structuri.

Soluția de etanol 50% a îmbunătățit randamentul de extracție în câmp ultrasonic în comparație cu macerarea.

**Table 1**

Process efficiency for different extraction techniques applied to propolis.

Solvent	Extraction yield, %					
	5 days maceration [38]			US 100 min		
	2:1	4:1	6:1	2:1	4:1	6:1
water	0.206	0.306	0.485	0.010	0.076	0.117
25 % ethanol	0.228	0.273	0.416	0.382	0.362	0.487
50 % ethanol	4.25	6.01	8.20	12.38	24.67	23.20

Figura S2 arată că acizii cafeic, ferulic și p-coumaric au fost cei mai bine extrași în apă, la temperatura camerei (Fig. S2).

Tratamentul US a permis solubilizarea flavonoidelor chiar și în extractele apoase. Pinocembrina a fost lider, cu o medie de 14,6 μg/g, însoțită de izorhamnetină, 9,6 μg/g, și de

cantități mici de crisină, 4,6 μg/g în proba 6UA10.

Acidul elagic a fost cel mai important acid extras în etanol 50 %, 38,6 mg/g. Resveratrolul și rutina au fost extrase la aproximativ 18 mg/g. Acidul cafeic nu a depășit valorile extrase în etanol 25 % (0,8 mg/g), dar derivatul său CAPE, a crescut semnificativ (24 mg/g în 6UEE100).

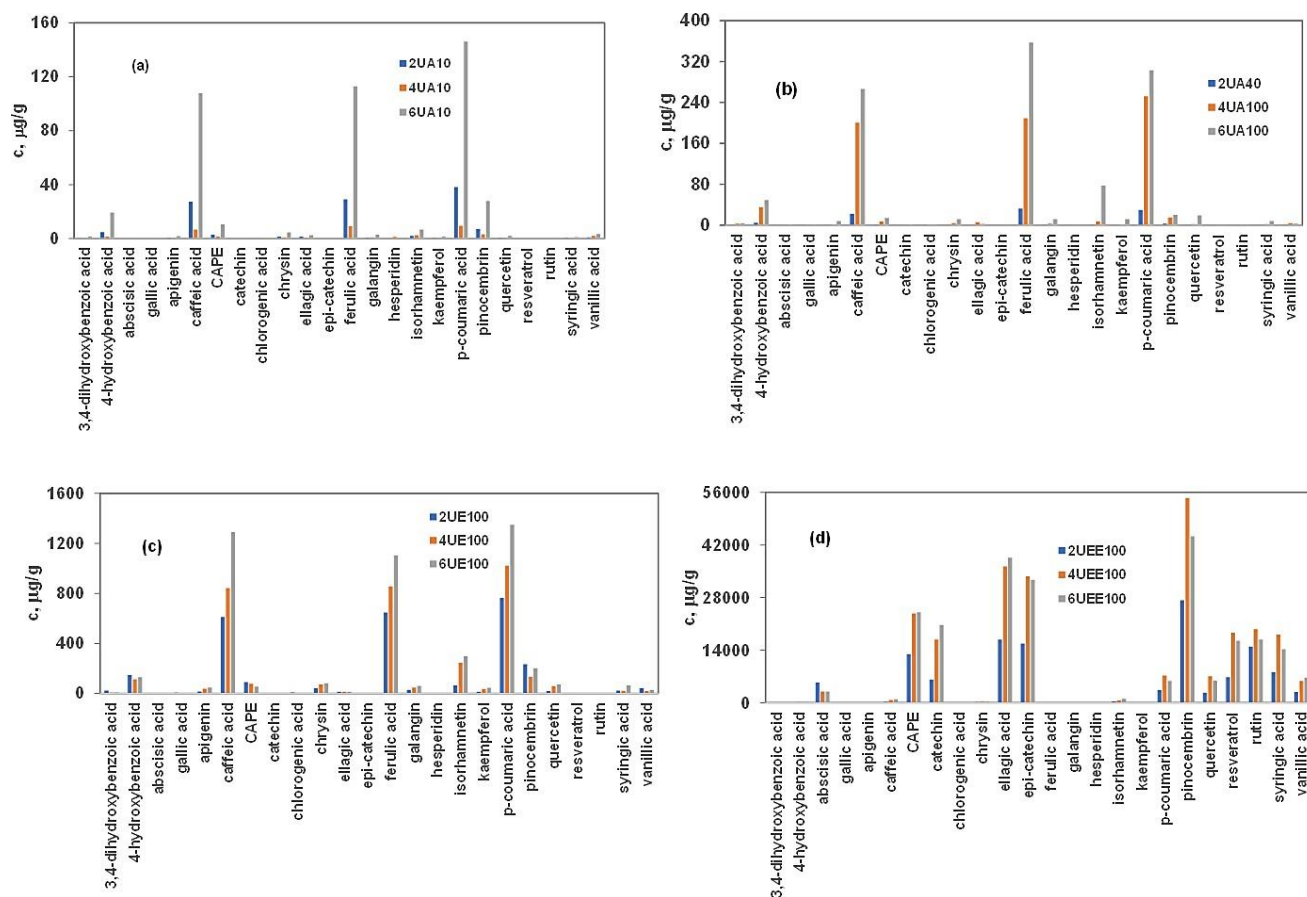


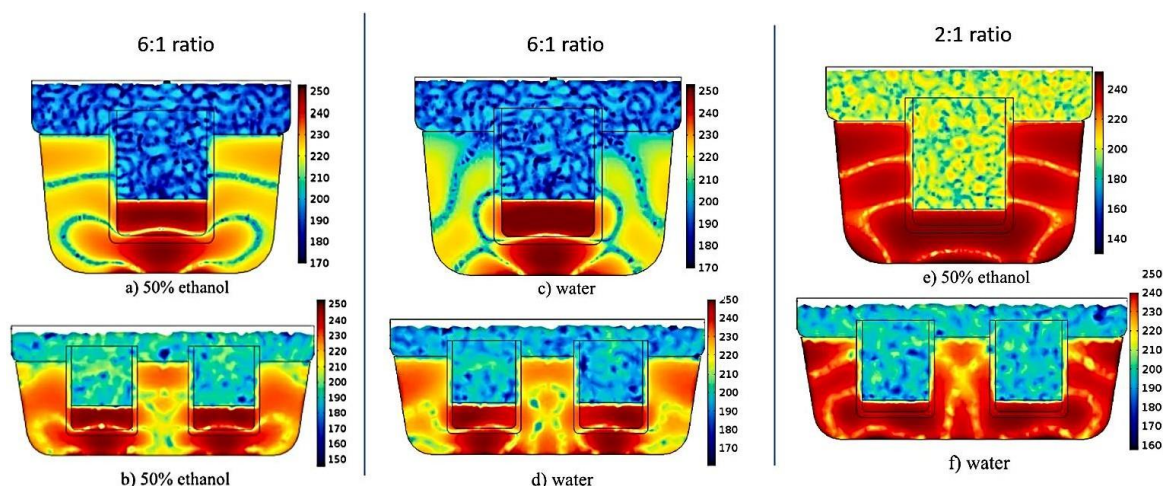
Figura S2. Profilurile polifenolilor din (a - b) extractele apoase, (c) 25% și (d) 50% etanolice, în câmpul american, și diferite timpuri de expunere.

Topologia câmpului ultrasonic (Fig. 2.) a fost puternic influențată atât de proprietățile fizice ale fluidului în care s-a dezvoltat, cât și de nivelul acestuia în vas, ceea ce a contribuit la obținerea unor profiluri polifenolice diferite pentru diferite concentrații de soluție hidroalcoolică. Pentru aceleași caracteristici ale parametrilor câmpului de ultrasunete (amplitudinea traductorului și puterea de intrare), distribuția nodurilor și a ventrelor va fi diferită pentru diferite fluide supuse câmpului, în aceeași baie cu ultrasunete, păstrând același lichid de cuplare (Fig. 2).

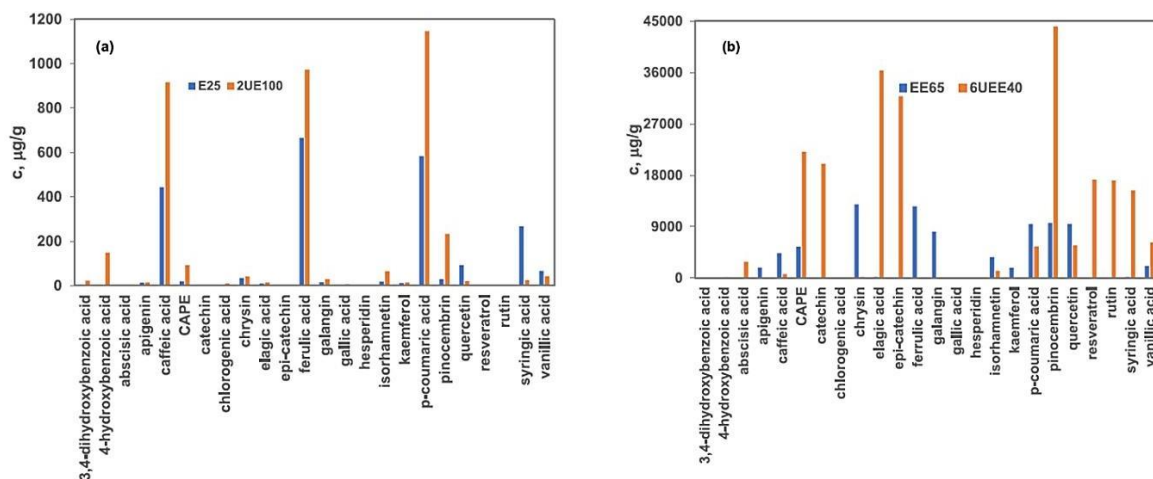
Densitatea, vâscozitatea și tensiunea interfacială sunt proprietățile principale care vor dicta topologia nodurilor și a ventrelor, împreună cu distribuția câmpului între ele. Pentru a ilustra acest lucru, au fost utilizate două fluide, etanol 50 % (densitate 900 kg/m<sup>3</sup>, vâscozitate 1,05 mPa·s, tensiune interfacială 21,8 mN/m, Fig. 2a, b și e) și apă (densitate 1000 kg/m<sup>3</sup>, vâscozitate 1 mPa·s, tensiune interfacială 72 mN/m, Fig. 2c, d și f), în timp ce apa a fost aleasă ca lichid de cuplare în baia cu ultrasunete. Distribuția câmpului ultrasonic a fost calculată pentru intensitatea și frecvența menționate mai sus, paharele fiind umplute cu cantitățile corespunzătoare celui mai mare raport, 6:1, și celui mai mic, 2:1. Calculele au fost efectuate folosind fizica acustică din COMSOL Multiphysics® 5.2a (modelul de fluid ales a fost elastic liniar), geometria băii cu ultrasunete fiind implementată folosind primitive geometrice COMSOL.



Fig. 2a-d arată în mod clar că câmpul de distribuție calculat este complet diferit pentru cele două fluide prezente în pahar, ceea ce trebuie să se reflecte în interacțiunile dintre câmpul US și faza solidă - prin urmare, atunci când se explică diferențele dintre performanțele diferiților solvenți supuși unui câmp US, menținând aceleași condiții de operare, distribuția câmpului ar trebui să fie luată în considerare, ca o cauză ascunsă, dar puternică. Topologia câmpului US se va modifica, de asemenea, atunci când nivelul substanțelor de extracție din pahar (sau din orice alt tip de recipient) se schimbă, chiar dacă înălțimea deasupra transductorului rămâne aceeași (Fig. 2e și f, față de Fig. 2a și d).



**Fig. 2.** Distribuția câmpului US în secțiunile transversale YZ, care trece prin centrul unuia dintre transductoare (a, c și e) și XZ, care trece prin centrul băii US (b, d și f). Etanolul 50 % (a și b) și apa (c și d) se află în pahare, pentru cazul raportului 6:1, în timp ce etanolul 50 % (e) și apa (f) se află în pahare, pentru cazul raportului 2:1, apa fiind lichidul de cuplare.



**Fig. 3.** Variația profilului polifenolic al extractelor în funcție de nivelul de etanol și de raportul lichid:solid pentru: (a) 25 % etanol, raport lichid:solid de 2:1, 5 zile de macerație (E25) și 100 de minute în baie cu ultrasunete (2UE100); (b) extracte cu 50 % etanol, raport lichid:solid de 6:1, 5 zile de macerație (EE65) și 40 de minute în baie cu ultrasunete (6UEE40).

Capacitatea antioxidantă a extractelor apoase din SUA a reprezentat aproximativ 30% din valorile obținute după o macerare de 5 zile la orice raport lichid:solid. Extractele etanolice 25% au prezentat capacități antioxidante destul de asemănătoare, fie prin macerare, fie prin expunere de 100 de minute în câmp cu US (Fig. 4). Reducerea timpului de extracție a fost principalul plus. Creșterea de trei ori mai mult a antioxidanților extrași a fost urmată îndeaproape de valorile TEAC ale extractelor etanolice de 50 %.

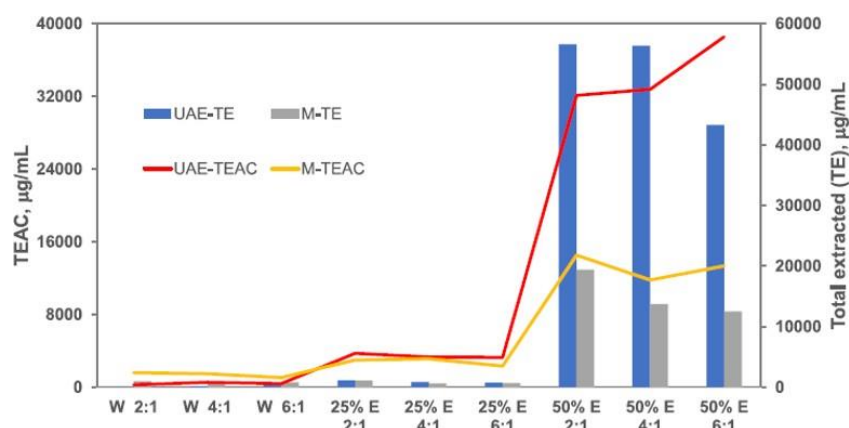


Fig. 4. Variația capacității antioxidante și a compușilor extrași totali în funcție de condițiile experimentale în EAU pentru 100 de minute și macerare de 5 zile la rapoarte lichide:solide similare (2:1, 4:1, 6:1, w:w) în apă (W), 25 % și 50 % etanol ca solvenți. Datele privind macerarea au fost raportate anterior [38]

Reprezentarea probelor UAE în coordonate PC1-PC2 a evidențiat o tendință clară de grupare în funcție de solventul utilizat (Fig. 5). Probele nu s-au diferențiat în funcție de raportul lichid:solid și de timpul de UAE pentru extractele de apă. Separarea este ușor mai mare pentru extractantul etanolic 25 %, dar, totuși, toate probele fac parte din aceeași elipsă. Extractul de apă obținut la un raport lichid:solid de 6:1 și un timp maxim de US (6UA100) se suprapune cu probele cu 25 % etanol, în principal cu raportul lichid:solid de 2:1 (2UE100), sugerând un profil polifenolic similar. Acest lucru ar putea ștampila eșantionul 6UA100 ca fiind aberant.

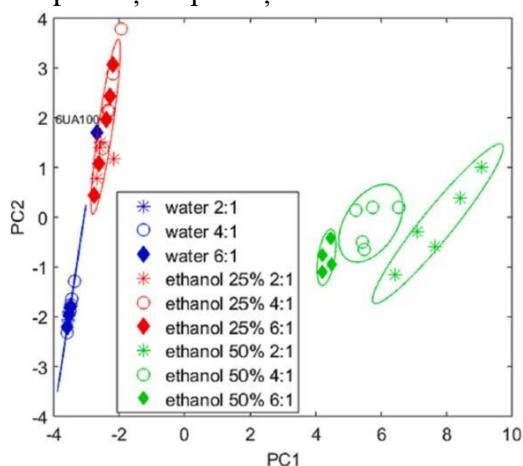


Fig. 5. Proiecțiile în coordonate PCA ale eșantioanelor obținute în EAU.

PCA aplicată atât pentru probele de macerare, cât și pentru probele din EAU (PC1 59,2 %, PC2 33,2 %) a condus la o separare clară a probelor etanolice de 50 % obținute pe teren în SUA și prin macerare (Fig. 7a). Extractele de apă și cele de 25 % etanol se suprapun practic (Fig. 7b), ceea ce demonstrează că US field nu a modificat esențial profilul polifenolicilor.

PCA demonstrează că natura solventului este factorul principal care diferențiază profilul polifenolic, în timp ce câmpul US și raportul lichid:solid joacă un rol important în cazul etanolului 50 %, unde sunt extrași derivați polifenolici cu structură complexă (în principal flavonoide).

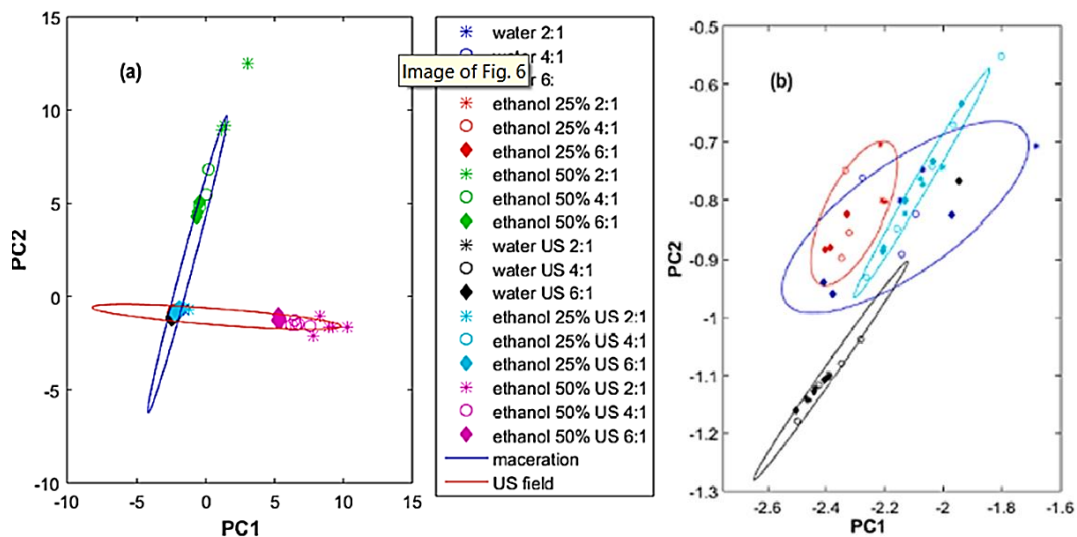


Fig. 7. Proiecții în coordonate PC1-PC2 ale probelor obținute utilizând atât rezultatele extracției prin macerare [38], cât și cele ale extracției US: (a) gruparea de-a lungul câmpului de macerare vs. US; (b) prim-plan pentru proiecțiile în coordonate PC1-PC2 ale probelor de apă și de etanol 25 %.

Capacitatea antioxidantă maximă prezisă de modelul de saturatie (Fig. 8.) este destul de apropiată de datele experimentale obținute pentru extractele etanolice 50 %. În general, datele se potrivesc bine cu modelul propus, dar există un model neașteptat, observat mai bine pentru probele de etanol 50 %, la raporturile lichid: solid 2:1 și 4:1 (Fig. 8.): există probe cu un conținut mai mare de polifenoli care au o capacitate antioxidantă similară sau mai mică. La un raport lichid:solid de 6:1, datele urmează regula generală de creștere a capacității antioxidante odată cu creșterea concentrației de polifenoli.

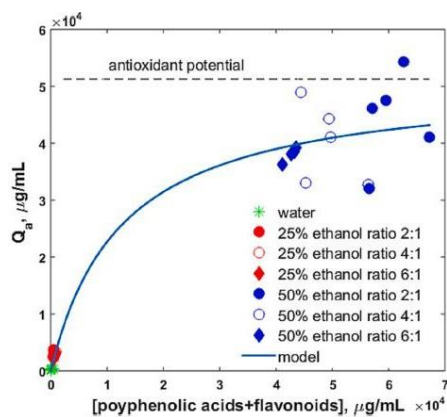


Fig. 8. Variația capacității antioxidante în funcție de concentrația totală de polifenoli.

Profilurile rapoartelor 2:1 și 4:1 lichid:solid variază în funcție de durata câmpului din SUA, ceea ce arată că concentrația anumitor polifenoli nu crește în mod constant, posibil din cauza reacțiilor chimice cauzate de radicalii liberi. Profilul concentrațiilor raportului lichid:solid 6:1 din figura 9 este aproape constant în timp.



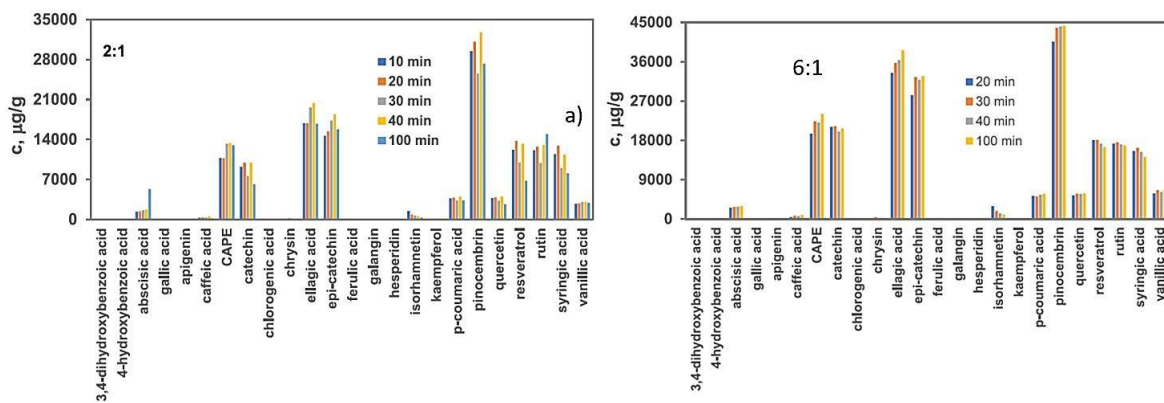


Fig. 9. Profiluri ale derivaților polifenolici pentru un raport lichid:solid de 2:1 și 6:1 în etanol

### Activitatea antimicrobiană

Influența timpului de expunere la SUA asupra activității antibacteriene împotriva *E. coli* a crescut pentru raportul 2:1, în timp ce pentru raportul 4:1 și 6:1, s-au înregistrat valori mai mari pentru zonele de inhibiție pentru 10 și, respectiv, 40 de minute.

Bacteriile Gram-pozitive (*B. subtilis*) au fost cel mai mult inhibate de raportul 2:1, lichid:solid și de timpul de expunere moderat la extractul US (2UA20). Al doilea cel mai bun efect inhibitor l-a avut extractul 6UA100, arătând astfel că modificarea topologiei câmpului US a fost benefică pentru cel mai lung timp de extracție. Extractul apos 2UA100 a avut efectul inhibitor maxim asupra bacteriei Gram-negativă *E. coli*.

Activitatea antimicrobiană pentru extractele de propolis cu etanol 25 % este moderată. Cel mai eficient extract pentru *E. coli* este 4UE10. Extractele de propolis în etanol 50 % în prezența US sunt cele mai eficiente din punct de vedere al activității antimicrobiene, inhibarea maximă fiind asigurată de extractul 2UEE20 împotriva *B. subtilis* și de 2UEE100 împotriva *E. coli*.

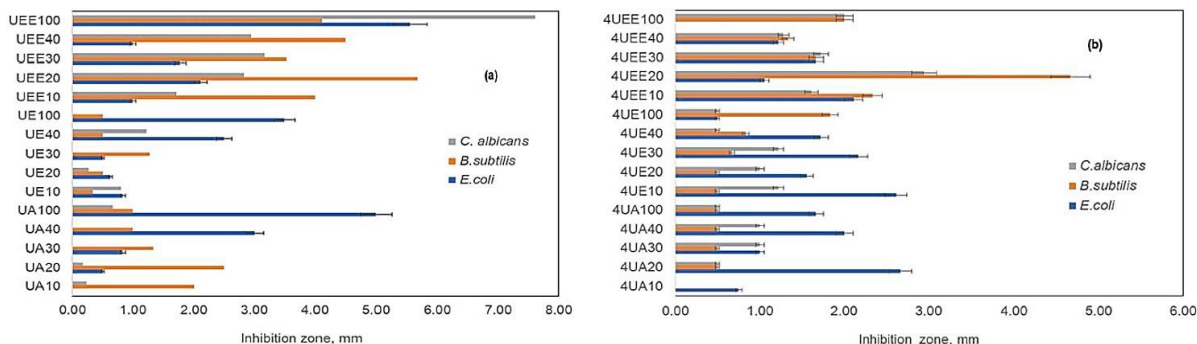


Fig. 10. Activitatea antimicrobiană înregistrată după 24 de ore în extractele UAE obținute la diferite rapoarte lichid:solid: (a) 2:1 și (b) 4:1.

## Concluzii generale

1. Experimentele și prelucrarea datelor au condus la concluzia că profilul polifenolic al extractelor este important pentru determinarea capacității antioxidante și antimicrobiene.

2. Variația profilului este dată, în primul rând, de natura solventului (etanolul 50% s-a dovedit a fi cea mai bună opțiune), apoi de raportul solid/lichid și, într-o măsură foarte mică, de dimensiunea particulelor.

3. Rapoarte lichid/solid mai mici decât cele menționate în literatura de specialitate s-au dovedit a fi eficiente în ceea ce privește randamentul și timpul de extracție, asigurând astfel un consum mai mic de extractant și evitând etapele ulterioare de concentrare a produsului final.

4. Apa, ca solvent de extracție, nu s-a dovedit a fi favorabilă pentru extracția polifenolilor cu solubilitate scăzută în apă, la fel ca și etanolul 25%, a cărui compoziție nu favorizează extracția tuturor compușilor.

5. Utilizarea câmpului de ultrasunete duce la creșterea eficienței extracției, dar determină și o modificare semnificativă a profilului polifenolic, ceea ce duce la modificări ale capacității antioxidante și antimicrobiene.

6. Raportul solid/lichid influențează profilul polifenolic în cazul extracției în câmp ultrasonic. În cazul unui raport solid/lichid scăzut, procesul de cavitație care are loc la suprafața lichidului produce modificări ale profilului polifenolic datorită apariției radicalilor hidroxil, HO-, care sunt mai susceptibili de a fi generați atunci când se utilizează cantități mici de solvent.

7. Analiza HPLC-MS s-a dovedit a fi eficientă în cuantificarea compoziției extractelor, permițând, prin metode statistice adecvate, analiza diferențierii extractelor și a influenței profilului asupra proprietăților investigate (capacitatea antioxidantă și activitatea antimicrobiană).

8. Analiza spectrelor UV-VIS, o abordare ieftină și simplă în comparație cu tehnicile cromatografice și cu alte tehnici mai sofisticate, permite prezicerea capacității antioxidante, având în vedere că spectrul variază în funcție de compoziția extractului obținut în diferite condiții (diferite tipuri de solvenți și granulometrie).

9. Cele mai bune condiții de operare în ceea ce privește producerea de extracte cu o activitate antioxidantă și antimicrobiană ridicată au necesitat ultrasunete ca tehnică de intensificare și etanol 50% ca solvent, dovedind că o creștere suplimentară a conținutului de etanol nu aduce îmbunătățiri semnificative ale proprietăților extractelor.

## Contribuții originale

1. Principala contribuție originală a acestei teze constă în evidențierea influenței profilurilor polifenolice obținute în diferite condiții de operare asupra capacității antioxidante și activității antimicrobiene a extractelor. Influența profilului asupra proprietăților extractelor ar putea fi atribuită acțiunilor sinergice ale polifenolilor extrași diferit în funcție de modalitățile de prelucrare.

2. Alegerea condițiilor de operare pentru extracția prin macerare a avut în vedere fezabilitatea practică a procesului și condițiile rezonabile din punct de vedere economic. A fost aleasă o temperatură de 25 °C și o durată de până la 5 zile. Studiul a demonstrat că o concentrație etanolică mai mare de 50% în solvent și o durată mai mare de 3 zile nu aduc îmbunătățiri semnificative.

3. La extracția în ultrasunete s-au folosit condiții izoterme, în jurul valorii de 25 °C. Astfel, a fost evitat efectul creșterii temperaturii cauzat de ultrasunete. Într-un proces izotermic, a fost posibil să se evidențieze rolul câmpului ultrasonic în modificarea profilului polifenolic, împreună cu creșterea considerabilă a capacității antioxidante și antimicrobiene.

4. În ceea ce privește cele mai eficiente dimensiuni ale particulelor de propolis pentru eficiența extracției, a fost identificat un interval de 200-600 μm, care poate fi obținut cu ușurință.

5. Utilizarea unor raporturi lichid/solid reduse, cu scopul de a asigura un consum redus de extractant și de a evita concentrarea suplimentară a extractelor.

6. Influența tipului de solvent și a raportului lichid/solid asupra profilului polifenolic în extracția cu ultrasunete a fost pusă în evidență prin modelarea topologiei câmpului de ultrasunete. Proprietățile fizice ale fluidului, dar și nivelul lichidului din recipient, s-au dovedit a modifica distribuția nodurilor și a ventrelor. Topologia câmpului US s-a dovedit a influența profilul polifenolicilor. La un nivel scăzut al lichidului (raport lichid/solid mic), fenomenul de cavitație și radicalii liberi care se formează la interfața solid-lichid pot produce modificări în distribuția concentrației compușilor polifenolici.

7. Investigarea profilului polifenolic în timpul extracției cu ultrasunete a pus în evidență evoluția diferită a concentrației fiecărui component. Unii compuși cresc în concentrație, în timp ce alții scad, ceea ce poate fi explicat prin formarea de radicali liberi indusă de câmpul US care interacționează cu unii compuși prezenți în extract, modificând profilul polifenolic. Influența profilului polifenolic asupra capacității antioxidante este clar evidențiată în cazul extracției în câmp de ultrasunete la un raport solid/lichid de 2/1, folosind o soluție etanolică de 50%, unde, odată cu creșterea duratei de extracție, concentrația totală a compușilor polifenolici crește ușor, dar capacitatea antioxidantă variază puternic și are valori mai mari pentru concentrații totale mai mici.

8. Metodele de modelare propuse și validate, bazate pe statistica multivariată (PCA și PLS) și pe optimizare, au fost capabile să coreleze capacitatea antioxidantă cu conținutul total de polifenoli și cu profilul polifenolic.

9. Cu ajutorul PCA, a fost evidențiată separarea clară a extractelor în funcție de solventul utilizat; o separare mai bună a fost evidențiată în cazul extractelor obținute prin US decât în cazul extractelor obținute prin macerare, ceea ce demonstrează că solventul și US contribuie la modificarea profilurilor polifenolice. Studiul PCA a evidențiat, de asemenea, clase distincte în funcție de raportul lichid/solid pentru extractele obținute în câmp de ultrasunete, în solvent etanolic 50%, ca urmare a modificării topologiei câmpurilor.

10. Modelul original de tip saturație propus pentru a corela capacitatea antioxidantă cu conținutul total de acizi polifenolici și de flavonoide a pus în evidență creșterea abruptă a capacității antioxidante în cazul în care conținutul de etanol crește de la 25% la 50%. O creștere suplimentară a concentrației de etanol nu duce la o creștere semnificativă a capacității antioxidante.

11. Corelația dintre compoziția extractelor și capacitatea antioxidantă, realizată prin PLS, a permis evidențierea importanței reale a fiecărui compus în constituirea capacității antioxidante. Unii compuși au o influență mai mare în predicția capacității antioxidante. În cazul extractelor etanolice de 50%, contribuția cea mai mare o au unii acizi polifenolici (ferulic, cafeic și p-cumaric) și flavonoide, cum ar fi crizina, kaempferolul, galangina și quercetina

pentru extracția prin macerare și acidul siringic, acidul p-cumaric, acidul elagic, catehina, epicatehina, izorhamnetina și resveratrolul în cazul extracției cu ultrasunete.

12. Activitatea antimicrobiană a extractelor este influențată de profilul polifenolic. Extractul etanolic de 50% obținut în domeniul US s-a dovedit a avea cea mai mare activitate antimicrobiană, explicată prin contribuția pinocembrinei, epicatehinei, resveratrolului și a acidului siringic, care sunt în concentrații ridicate.

13. Modificarea topologiei câmpului de ultrasunete are o influență importantă asupra profilului compușilor polifenolici din extractele apoase care, în comparație cu cel obținut prin macerare, au avut o activitate antimicrobiană crescută împotriva microorganismelor *E. coli* și *B. subtilis*. Unele dintre probele apoase au o activitate inhibitorie apropiată de cea a probelor etanolice (25% și 50%) obținute prin ultrasunete, iar altele chiar mai mare. Acest lucru este atribuit, în principal, diferențelor în profilul de concentrație al compușilor antimicrobieni din toate probele supuse extracției cu ultrasunete, care variază în funcție de tipul de solvent și de volumul acestuia în brutărie.

14. A fost elaborată o metodă rapidă pentru estimarea conținutului de polifenoli și a capacității antioxidante, utilizând spectrele UV ale extractelor ușor de obținut experimental.

## Diseminarea rezultatelor

### Lucrări publicate

- 1) Nichitoi, M. M. M.; Josceanu, A. M.; Isopescu, R. D.; Isopencu, G.; Lavric V. "Romanian propolis extracts: characterization and statistical analysis and modelling", U.P.B. Sci. Bull., Series B, **2019**, 81(4), 149-162, WOS:000501994100014
- 2) Nichitoi, M. M. M.; Costache, T. A.; Josceanu, A. M.; Isopescu, R. D.; Isopencu, G.; Lavric, V. "Development and Application of an LC-MS/MS Method for Identification of Polyphenols in Propolis Extract", *Proceedings*, vol. 55, nr. 10, pp. 1-5, 2020, doi: 10.3390/proceedings2020055010.
- 3) Nichitoi, M.M; Josceanu, A. M.; Isopescu, R. D.; Geană, E. I.; Ciucure, C.T.; Lavric, V. "Polyphenolics profile effects upon the antioxidant and antimicrobial activity of propolis extracts", *Sci. Rep.* vol. 11, no. 20113, 2021, 2021, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97130-9>, WOS:000706395800043, Impact Factor: 4.996
- 4) Nichitoi, M. M.; Josceanu, A.M.; Isopescu, R.D.; Isopencu, G.O.; Geană, E.I.; Ciucure, C. T.; Lavric, V., "Do ultrasonic field effects upon the polyphenolics profile of propolis extracts improve their antioxidant and antimicrobial activity?", *Ultrason. Sonochem.*, vol. 92, 2023, doi: 10.1016/j.ultsonch.2022.106274, WOS: 000911315500001, Impact Factor: 9.336

### Conferințe

- 1) Nichitoi, M. M. M.; Josceanu, A. M.; Isopescu, R. D.; Isopencu, G.; Lavric V. "Romanian Propolis Evaluation", 4<sup>th</sup> International Conference on Analytical Chemistry 1-3 septembrie 2018, București, România.

- 2) Nichitoi, M. M. M.; Josceanu, A. M.; Isopescu, R. D.; Isopencu, G. O.; Lavric V. "Romanian propolis extracts - Characterization and statistical analysis and modelling", 21<sup>st</sup> Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering 4-7 September 2019, Mamaia-Constanța, România.
- 3) Nichitoi, M. M.; Costache, T. A.; Josceanu, A. M.; Isopescu, R. D.; Isopencu, G.; Lavric V. "Development and application of a LC-MS/MS method for identification of polyphenols in propolis extract", Eurachem Online Workshop - Quality Assurance Elements for Analytical Laboratories in the University Curriculum, 14-15 July 2020, Bucharest, Romania.
- 4) Nichitoi, M. M.; Josceanu, A. M.; Isopescu, R. D.; Costache, T. A.; Lavric V. "Analiza avansată în extracția compușilor polifenolici din propolisul românesc", 22<sup>nd</sup> Romanian International Conference on chemistry and Chemical Engineering, 7-8 sept. 2022, Sinaia, România.

Prezentul rezumat include într-o formă concisă conținutul capitolelor 1-4. Numerotarea capitolelor, a subcapitolelor și a tabelelor corespunde cu cea din teză. Sunt prezentate referințele bibliografice semnificative utilizate în lucrare.

#### Bibliografie selectivă:

- [10] S. Kumazawa, "Bioactive compounds in bee propolis for drug discovery", *AIP Conf. Proc.*, vol. 1933, pp. 1-6, 2018, doi: 10.1063/1.5023948.
- [14] A. Kurek-Górecka, A. Rzepecka-Stojko, M. Górecki, J. Stojko, M. Sosada, G. Swierczek-Zieba, "Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis", *Molecules*, vol. 19, no.1, pp. 78–101, 2014, doi: 10.3390/molecules19010078.
- [15] I. Przybyłek and T. M. Karpiński, "Antibacterial properties of propolis", *Molecules*, vol. 24, no. 11, pp. 11–13, 2019, doi: 10.3390/molecules24112047.
- [16] A. Durazzo, M. Lucarini, E.B. Souto, C. Cicala, E. Caiazzo, A.A. Izzo, E. Novellino, A. Santini, "Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health", *Phyther. Res.*, vol. 33, no.9, pp. 2221–2243, 2019, doi: 10.1002/ptr.6419.
- [20] N. Kalogeropoulos, S. J. Konteles, E. Troullidou, I. Mourtzinou, V. T. Karathanos, "Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus", *Food Chem.*, vol. 116, no. 2, pp. 452–461, 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.02.060.
- [21] M. Popova, V. Bankova, D. Butovska, V. Petkov, B. Nikolova-Damyanova, A.G. Sabatini, G.L. Marcazzan, S. Bogdanov, "Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis", *Phytochem. Anal.*, vol. 15, no. 4, pp. 235–240, 2004, doi: 10.1002/pca.777.
- [22] S. Kumazawa, T. Hamasaka, T. Nakayama, "Antioxidant activity of propolis of various geographic origins", *Food Chem.*, vol. 84, no. 3, pp. 329–339, 2004, doi: 10.1016/S0308-8146(03)00216-4.
- [23] E. Gregoris, R. Stevanato, "Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis", *Food Chem. Toxicol.*, vol. 48, no. 1, pp. 76–82, 2010, doi: 10.1016/j.fct.2009.09.018.
- [24] A. N. Croci, B. Cioroiu, D. Lazar, A. Corciova, B. Ivanescu, M. I. Lazar, "HPLC evaluation of phenolic and polyphenolic acids from propolis", *Farmacia*, vol. 57, no. 1, pp. 52–57, 2009.
- [25] R. Socha, D. Gałkowska, M. Bugaj, L. Juszczak, "Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland", *Nat. Prod. Res.*, vol. 29, no. 5, pp. 416–422, 2015, doi: 10.1080/14786419.2014.949705.
- [26] A. Mavri, H. Abramovič, T. Polak, J. Bertonec, P. Jamnik, M. S.S. Možina, B. Jeršek, "Chemical properties and antioxidant and antimicrobial activities of slovenian propolis", *Chem. Biodivers.*, vol. 9, no. 8, pp. 1545–1558, 2012, doi: 10.1002/cbdv.201100337.
- [27] F. Gatea, A. O. Matei, E. D. Teodor, G. L. Radu, "Antioxidant properties and polyphenols composition of some Roumanian propolis samples", *Rev. Roum. Chim.*, vol. 60, no.1, pp. 65–74, 2015.
- [56] A. Aires, "Phenolics in Foods: Extraction, Analysis and Measurements", *Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications*, Intech, pp. 61-88, 2017, doi: 10.5772/66889.

- [57] N. E. Bayram and Y. C. Gercek, "Appropriate maceration duration for the extraction of propolis", *Fresenius Environmental Bulletin* vol. 28, no. 1, 188-192, 2020.
- [73] B. K. Tiwari, "Ultrasound: A clean, green extraction technology", *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 71, pp. 100–109, 2015, doi: 10.1016/j.trac.2015.04.013.
- [74] S. Rodrigues, F.A.N. Fernandes, "Extraction Processes Assisted by Ultrasound", *Ultrasound: Advances for Food Processing and Preservation*, pp. 351–368, 2017, doi:10.1016/b978-0-12-804581-7.00014-2
- [87] M.M. Nichitoi, A.M. Josceanu, R.D. Isopescu, G.O. Isopencu, E.I. Geană, C.T. Ciucure, V. Lavric, "Do ultrasonic field effects upon the polyphenolics profile of propolis extracts improve their antioxidant and antimicrobial activity?", *Ultrason. Sonochem.*, vol. 92, 2022, doi: 10.1016/j.ultsonch.2022.106274.
- [102] T. Margraf, A. R. Karnopp, N. D. Rosso, and D. Granato, "Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates," *J. Food Sci.*, vol. 80, no. 11, pp. C2397–C2403, 2015, doi: 10.1111/1750-3841.13077.
- [109] T. Ozdal, F. D. Ceylan, N. Eroglu, M. Kaplan, E. O. Olgun, E. Capanoglu, "Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis", *Food Res. Int.*, vol. 122, no. May, pp. 528–536, 2019, doi: 10.1016/j.foodres.2019.05.028.
- [115] M.M. Nichitoi, A.M. Josceanu, R.D. Isopescu, G. Isopencu, V. Lavric, "Romanian propolis extracts: Characterization and statistical analysis and modelling", *UPB. Sci. Bull, Series B* 2019, 81, 149–162.
- [118] C. Henriquez, C. Aliaga, E. Lissi, "Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures," *Int. J. Chem. Kinet.*, vol. 34, no. 12, pp. 659–665, 2002, doi: 10.1002/kin.10094.
- [128] S. B. Kedare, R. P. Singh, "Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 48, no. 4, pp. 412–422, 2011, doi: 10.1007/s13197-011-0251-1.
- [148] M.M. Nichitoi, A.M. Josceanu, R.D. Isopescu, E.I. Geana, C.T. Ciucure, V. Lavric, "Polyphenolics profile effects upon the antioxidant and antimicrobial activity of propolis extracts", *Sci. Rep.* vo. 11, no. 20113, 2021, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97130-9>.
- [152] H. Abdi, L.J. Williams, "Principal Component Analysis-Overview", *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* 2010, 2, pp. 433-459, 2010, <https://doi.org/10.1002/wics.101>
- [153] H. Abdi, "Partial Least Squares Regression and projection on latent structure regression (PLS Regression)", *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* 2, pp. 97-116, 2010, <https://doi.org/10.1002/wics.51>
- [154] K. Héberger, "Chemoinformatics-multivariate mathematical-statistical methods for data evaluation", *Medical Applications of Mass Spectrometry*, pp. 141–169, 2008, doi:10.1016/b978-044451980-1.50009-4
- [155] M.R. Gabor, D. Ștefănescu, L. Conțiu, "The Application of Main Component Analysis Method on Indicators of Romanian National Authority for Consumers Protection Activities", *The Amfiteatru Economic*. Vol XII, No. 28. pp. 313-330, 2010