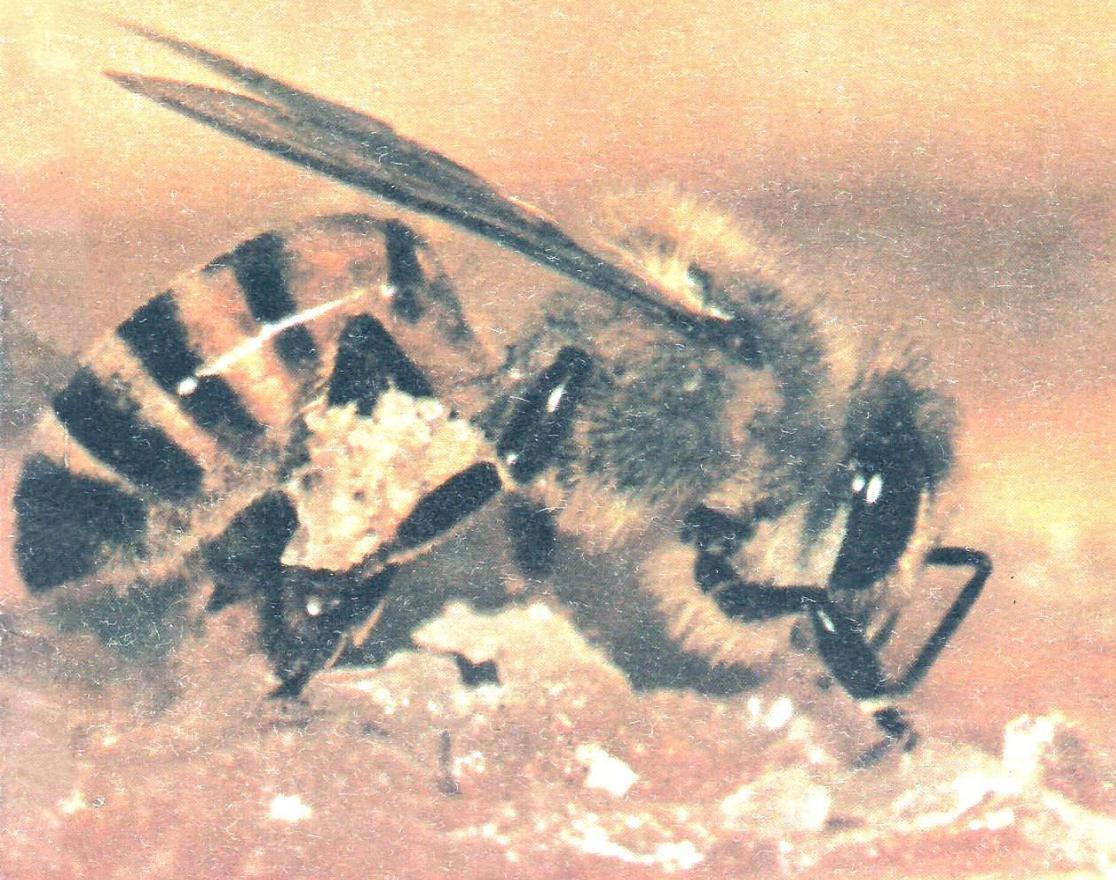


DIN TAINELE STUPULUI

# PROPOLIS



APIMONDIA

A P I M O N D I A

UN PREȚIOS PRODUS AL APICULTURII

# **P R O P O L I S U L**

**(Ediția a IV-a, revizuită și adăugită)**

B U C U R E Ş T I  
1 9 9 0

**COORDONATORI ȘTIINȚIFICI :**

Farmacist ELENA PALOŞ  
Biochimist CRISTINA MATEESCU

**REDACTOR RESPONSABIL :**

ANCA VASILESCU

## *Cuvînt înainte*

*In ultimii ani, pe plan mondial s-au întreprins ample acțiuni în vederea folosirii pe scară tot mai largă a produselor naturale în scopul menținerii sănătății omului.*

*In acest context oamenii de știință au inițiat diferite cercetări privind albina și stupul, în vederea valorificării integrale a tuturor produselor oferite de acestea : miere, lăptișor de matcă, polen, păstură, propolis, veninul de albine, apilarnil și ceară, produse cu un bogat conținut în principii active ce joacă un rol tot mai de seamă în apărarea sănătății omului.*

Plecind de la această nobilă idee Editura APIMONDIA a prezentat o serie de lucrări care oferă specialiștilor și publicului larg informații și observații dobândite în urma unor îndelungate cercetări a acestor produse naturale puse la îndemâna noastră cu generozitate de albine. Cartea pe care o oferim acum „Propolisul“ este o lucrare cu caracter monografic despre acest produs al stupului foarte apreciat datorită efectelor sale binefăcătoare. Lucrarea cuprinde date despre originea propolisului, colectarea lui de către albine și recoltarea de către om, macro și microstructura lui, utilizarea în medicină și efectele asupra sistemelor biologice precum și forme farmaceutice preparate pe bază de propolis. Monografia de față a preluat din edițiile mai vechi tot ce este mai valoros din punct de vedere științific dar ea cuprinde și cele mai recente cercetări și aplicări ale propolisului în medicina umană, lucrări ale unor specialiști, biologi, chimici, medici, farmaciști din diverse țări care și-au consacrat o parte din activitatea lor științifică studierii

*acestui produs cu valoare de medicament. Prin publicarea lucrărilor în forma lor originală am intenționat să punem la îndemâna producătorilor pe de o parte, și a practicienilor apiterapeuți pe de altă parte, un material informativ-documentar care să oglindească stadiul actual al cunoștințelor despre propolis și perspectivele multiple ale utilizării lui. Lucrarea poartă girul acestor specialiști competenți care și-au prezentat referatele cercetărilor lor la diferitele manifestări științifice organizate de APIMONDIA în lume. Toți acești cercetători care au studiat și studiază atât metodele de producere, compoziția chimică cît și efectele propolisului s-au străduit să introducă în arsenala terapeutică a medicinii moderne acest produs natural care și-a dovedit cu prisosință calitățile deosebite.*

*Mulțumim celor care, prin cercetările lor, și-au adus contribuția la realizarea prezentului volum și așteptăm cu deosebit interes noi rezultate și puncte de vedere, noi lucrări științifice care să ne permită o cît mai bună cunoaștere a acestui valoros produs al stupului.*

C. CONSTANTINESCU  
Director I.I.T.E.A. APIMONDIA

## Capitolul

### GENERALITĂȚI

#### SITUAȚIA CERCETĂRII PROPOLISULUI ASTĂZI

Oamenii de știință au întreprins diferite cercetări, constatăndu-se că albinele ocupă o poziție specială printre celelalte insecte, fiind rar atacate de bacterii, microbi sau virusuri. Însușirea de a se apăra selectiv de agentii patogeni este deosebit de prețioasă pentru albine, dacă ne gîndim la aglomerația mare de indivizi din coloniile de albine (50.000—60.000). La asemenea densitate, o boală infecțioasă are efecte dezastroase.

Cercetările au arătat că, pe lîngă acea substanță care protejează corpul albinei și care vădește însușirile unui antibiotic, în protecția albinei un rol important îl are propolisul.

Pentru producerea propolisului albinele culeg materia primă de pe mugurii unor vegetale, ca de exemplu plopul și salcia, atunci cînd vremea este călduroasă. Substanțele rășinoase de pe muguri sunt amestecate cu secreții ale unor glande ale albinelor, cu ceară și, mai rar, cu grăuncioare de polen. Astfel obțin ele propolisul cu care astupă orice orificiu din pereții stupului, lustruiesc celulele fagurilor unde depune matca ouăle, acoperă cu un strat subțire rezervele de substanță proteică (păstura) pe timpul conservării ei în perioada de iarnă, îmbâlsămează atmosfera din interiorul stupului și în ultimă instanță acoperă orice dăunător care a fost omorit de albine și nu a putut fi evacuat din stup, mumificîndu-l, astfel încît nu viață atmosfera din stup, datorită unei adevărate îmbâlsămări.

În cursul ultimului deceniu, propolisul a devenit obiectul unor cuprinzătoare studii cu caracter chimic și farmacologic. Deși este o substanță cunoscută încă din cele mai vechi timpuri, abia în zilele noastre s-au evidențiat adevăratele sale virtuți. Toate produsele apicole, printre care și propolisul, au fost utilizate ca leacuri naturale din timpuri străvechi ale antichității. Se susține că în imperiul incașilor în jurul anului 1600 propolisul era cunoscut, fiind folosit împotriva inflamațiilor însotite de temperatură. Si Coranul amintește de propolis, prezintîndu-l ca pe o substanță diferit colorată. De asemenea, vechii egipteni, grecii și romani îl foloseau ca remediu în diferite afecțiuni. O perioadă în-

delungată de timp a dispărut interesul față de acest produs, el fiind amintit din nou prin anul 1807 ca un mijloc de tratare a rănilor. În timpul războiului burilor (1899), propolisul în amestec cu vaselină, se utiliza cu rezultate bune în intervenții chirurgicale.

În ultima vreme, aşa-numitele produse secundare ale stupului : polenul, lăptişorul de matcă, propolisul și veninul au dobîndit o importanță tot mai mare prin utilizarea lor masivă în apiterapie. Pe de altă parte, obținerea acestor produse reprezintă o cale de diversificare a producției, ceea ce conferă oricărei exploatarii apicole posibilități sigure de creștere a eficienței economice și a rentabilității. Tocmai în această idee APIMONDIA a căutat să creeze un cadru unitar pentru schimburi și confruntări de opinii în stare să polarizeze interesul major pentru propolis ca și pentru celealte produse față de care se manifestă interes atât din partea apicultorilor producători cât și din partea oamenilor de știință, care au depus și depun strădani susținute pentru fundamentarea științifică a utilizării produselor apicole naturale în alimentația și sănătatea omului.

O primă grupă de acțiuni în această direcție o reprezintă simpozioanele organizate cu scopul promovării noilor preocupări legate de propolis, de alte produse apicole și pentru utilizarea acestora în slujba sănătății oamenilor. Menționăm că au fost organizate sub egida APIMONDIEI în Cehoslovacia două simpozioane internaționale având drept unică temă propolisul. Tot în această sferă de preocupări, acțiunile APIMONDIEI s-au materializat și prin cele cinci simpozioane internaționale de apiterapie : Madrid 1974, București 1976 și Portorož, (Iugoslavia), 1978, Cracovia, 1985, Portorož, 1988. Dacă în 1974 la Madrid numai 3 comunicări se refereau la propolis, în 1976, la București, s-au prezentat 44 de comunicări legate de compozitia și efectele terapeutice ale propolisului ca atare sau în combinație cu alte produse apicole. Cercetările, în marea lor majoritate, depășiseră stadiul de laborator și erau extinse în clinici asupra unor grupe de bolnavi care sufereau de diverse afecțiuni interne și externe. În afară de aceste comunicări prezentate în sesiunea plenară, a fost organizată o zi de dezbatere în cadrul unei mese rotunde având ca temă Propolisul, ceea ce a permis adâncirea și lămurirea unor aspecte în parte controversate, confruntarea și punerea de acord a punctelor de vedere divergente.

La al treilea simpozion internațional de apiterapie organizat în 1978 la Portorož, Iugoslavia, temele legate de propolis s-au regăsit în 34 de referate și comunicări științifice care în cea mai mare parte conțineau date finale în ideea cauze-efecte, sau, altfel spus, în conformitate cu principiul „a cunoaște cu adevărat înseamnă a cunoaște prin cauze“.

De asemenea, la toate manifestările științifice prilejuite de ultimele congrese ale APIMONDIEI au fost organizate secții specializate pe apiterapie. În cadrul lor tematica privind propolisul a ocupat un loc important, cîstigînd teren de la un congres la altul. În mod deosebit simpozioanele și mesele rotunde prilejuite de Congresele APIMONDIA — Atena 1979, Acapulco 1981, Budapesta 1983, Nagoya 1985, Varșovia 1987, au facilitat comunicarea unui volum important de date privind cercetările asupra propolisului.

O altă grupă de acțiuni o reprezintă activitatea publicistică și de propagandă tehnico-științifică desfășurată de APIMONDIA în domeniul folosirii produselor apicole pentru sănătate și alimentație.

Despre propolis, APIMONDIA a publicat o vastă literatură științifică în cadrul căreia numai domeniile de grupare a temelor însumează numeroase capitole, de la tehnologia producerii lui în stupină, analizele cantitative și calitative, pînă la utilizările lui în medicină cuprîndînd 15 specialități printre care amintim : O.R.L., stomatologie, boli interne, oftalmologie, dermatologie, ginecologie, urologie etc. Propolisul și-a găsit utilizarea și în medicina veterinară, unde rezultatele unor cercetări s-au dovedit destul de promîntoare. În cele 5 volume editate cu ocazia simpozioanelor de apiterapie, au apărut peste 150 de lucrări legate de propolis.

Culegerea de texte intitulată PROPOLISUL editată de APIMONDIA reunește referatele prezentate la diferite manifestări științifice organizate de APIMONDIA cît și articole apărute în ultimii ani în literatura apicolă, de biochimie, biologie, tehnologie, etc. În paralel, în revista „Apicta“, editată de APIMONDIA în 5 limbi, au apărut o serie de articole cu ultimele noutăți legate de acest domeniu. Immediat după înființarea, în 1975 la București, a Sectorului medical de apiterapie un colectiv largit de specialiști a elaborat o broșură intitulată „Apiterapia azi“, aflată la cea de-a III-a ediție, în care sunt redate noțiuni practice asupra compoziției și folosirii produselor și preparatelor apicole în nutriție și terapeutică, în raport cu valoarea lor biologică. Bineînțeles, în această broșură, propolisul și produsele pe bază de propolis s-au bucurat de o atenție deosebită.

Toate aceste cărți apărute în timp dovedesc realmente o preocupare statornică și perseverentă a APIMONDIEI pentru a propaga în rîndurile tuturor celor interesati, la toate nivelele, avantajele apiterapiei în general și în cadrul ei a propolisoterapiei în special.

Preocupările și acțiunile APIMONDIEI în acest domeniu s-au bazat pe entuziasmul unor valoroși cercetători de profil atât în ceea ce privește obținerea acestui produs al stupului cît și în utilizările lui concrete.

Toți cercetătorii care studiază atât metodele de producere, compoziția cît și efectele propolisului depun o muncă care merită stima și prețuirea noastră, străduindu-se să introducă în arsenalul terapeutic al medicinii moderne un produs natural care și-a dovedit cu prisosință calitățile deosebite.

APIMONDIA și-a înscris de mult în agenda sa de lucru promovarea resurselor naturale în domeniul sănătății omului, organizînd, după cum s-a arătat, sub egida sa manifestările științifice și activitatea de publicare în mai multe limbi a unor lucrări științifice care au cunoscut o largă răspîndire. Considerăm că au fost astfel sensibilizați o seamă de specialiști din diverse domenii care au devenit partizani ai apiterapiei.

Rațiunea care a stat la baza activității APIMONDIEI a fost aceea că evitînd empirismul și rutina, toate aspectele cunoașterii și utilizării nu numai a propolisului ci și a tuturor produselor stupului să fie aşezate pe baze rigurose științifice. Aceeași orientare a determinat și organi-

zarea în anul 1975 a Sectorului de apiterapie din Bucureşti, sector ce desfăşoară o intensă activitate de cercetare științifică în colaborare cu Academia de științe medicale, cu unele unități de cercetare ale Academiei și cu mai multe clinici universitare din capitală și din țară. Aici, în paralel cu activitatea terapeutică propriu-zisă se urmăresc unele aspecte noi de cercetare științifică și realizare a unor produse care să răspundă necesităților actuale. Colectivul de medici care activează în sector este completat de un grup de biochimiști, farmaciști și biologi.

Stadiul actual la care au ajuns cercetările legate de propolis obligă la unele reconsiderări atât în ceea ce privește produsul brut cât și utilizările largi ale lui sub formă de preparate dintre cele mai diverse. Astfel, apicultorul-producător direct al propolisului are deopotrivă două mari sarcini. Prima servește aspectul cantitativ, iar cea de-a doua aspectul calitativ al materiei prime. S-au pus la punct unele tehnici de producere și recoltare ale propolisului, tehnici care în unele țări se aplică pe scară largă. Grija pentru calitate este subsumată însăși destinației pe care o are propolisul — sănătatea oamenilor. Aceste aspecte nu pot fi despărțite de cel economic, întrucât prețul propolisului este stimulativ pe piața mondială manifestând o tendință de creștere, grație lărgirii ariei lui de utilizări.

Desigur, pentru producător cercetarea științifică poate încă face multe lucruri bune și în acest sens crearea unor linii și hibrizi de albine cu capacitate sporită de propolizare reprezentând o cale sigură de sprijinire a producătorilor. În domeniile cunoașterii căt mai exacte a compozitiei și a efectelor acestui produs complex există încă un cîmp larg de afirmare pentru chimici, biologi, biochimiști, farmaciști și medici. Conjugarea unor eforturi pluridisciplinare într-un spațiu de constelație ce cuprinde atât domeniile cercetării căt și ale producției reprezintă un mod de rezolvare favorabilă a problematicii comune pe drumul obținerii și utilizării propolisului și această conjugare, această sinergie a preocupărilor a încercat și încearcă să-o realizeze și să-o perfeccioneze mereu pe plan mondial APIMONDIA prin toate mijloacele care-i stau la dispoziție.

Desigur, utilizarea în terapeutică a produselor apicole necesită în continuare studii temeinice, efectuate cu ajutorul aparaturii științifice moderne, iar valorificarea rezultatelor trebuie făcută ținind cont de toate premisele interpretării riguroase, statistice. Considerind bunele rezultate de pînă acum se poate prevedea un viitor foarte bun folosirii în general a produselor naturale în slujba păstrării sănătății oamenilor, lucru subliniat de nenumărate ori de organismele internaționale, ca de exemplu Organizația Mondială a Sănătății.

Recunoașterea necesității de a reveni la folosirea a ceea ce ne oferă în mod direct natura este astăzi un lucru cîștigat de întreaga omenire. A cunoaște efectele și sensul utilizării produselor albinelor și ajutorul pe care-l reprezintă apiterapia, este un comandament al timpurilor actuale, în care știința cea mai avansată se conjugă cu experiența care s-a transmis de-a lungul mileniilor. Prin depășirea practiciei bazate pe tradiții, apiterapia — avînd un riguros suport științific — reafirmă legătura cu natura, cu izvorul ei de sănătate, vigoare și longevitate.

In cadrul acestei orientări moderne, utilizarea propolisului și a celorlalte produse ale stupului va cunoaște un loc de maximă importanță. Totul depinde de modul de abordare a aspectelor necunoscute sau insuficient cunoscute, de măsurile judicioase și raționale în stare să asigure rapid cele mai bune condiții pentru promovarea în practica largă medicală a acestui produs.

## CE ESTE PROPOLISUL

Propolis — este denumirea generică pentru substanța răšinoasă colectată de către albinele melifere din diferite surse vegetale. Cuvântul propolis derivă din grecescul : pro — pentru sau în apărarea și polis — cetate — ceea ce înseamnă apărarea cetății (în acest caz a stupului).

Ar fi interesant să se ia în considerație și o altă etimologie a acestui cuvânt, atribuindu-i o origine latină. De fapt Pliniu folosește acest termen de propolis... Construcția cuvântului provine prin asamblarea prefixului „pro“ — cu semnificația în scopul de, favorabil pentru și „polis“ — o formă de conjugare a verbului „polire“ — polir în franceză — a acoperi, a polei și prin deformare „lisser“ — a netezi.

În acest sens, se știe că albinele utilizează propolisul pentru a acoperi, toate părțile interioare ale stupului și în mod deosebit celulele goale, înnainte ca matca să depună puncta.

## PROVENIENȚA PROPOLISULUI

Termenul foarte general de propolis este utilizat pentru a desemna o întreagă serie de substanțe răšinoase, gumoase, balsamice, aduse în stup de către albine și transformate.

Cu toate că primii cercetători ce au observat comportamentul albinelor au fost conștienți de originea vegetală a acestuia, au existat totuși în ideile unor cercetători care au studiat compozitia propolisului o serie de neclarități. În privința originii propolisului există teorii ce afirmă o dublă origine :

1. *Origine internă* — potrivit cercetătorilor germani KUSTENMACHER, PHILIP și WECK etc., propolisul este un reziduu răšinos provenit din prima fază a digestiei polenului, proces ce are loc într-un mic organ situat între gușă și intestinul mediu. Conform ipotezei lui KUSTENMACHER propolisul provine din gușa de polen sau „stomacul de polen“ sau „chylus magen“ — organ situat între stomacul de miere și intestinul mediu. Învelișul exterior al grăuncioarelor de polen este transformat în balsam și regurgitat de către albină sub formă de picături depuse în stup. Prezența urmelor și fragmentelor de exină de polen în propolis a constituit un argument în acest sens. Mai mult decât atât, savantul german a apreciat că maximul recoltei de polen coincide cu maximul recoltei de propolis și că pe de altă parte, prezența propolisului

în interiorul stupilor situați în regiunile bogate în păduri, confirmă producerea sa pornind de la polen.

Procesul propriu-zis de formare a propolisului începe prin absorbirea unei mari cantități de apă. Grăuncioarele de polen înghițite de albine și acumulate într-o din porțiunile tubului digestiv în aşa-numitul „stomac de polen“ — chylus magen, se umflă datorită absorbției de apă de circa 5 ori mai mare decât propria lor greutate și apoi crapă. Din ele curge plasma pe care albinele o folosesc ca hrana pentru puiet. Din învelișul grăuncioarelor de polen ia naștere un balsam pe care albinele îl elimină sub formă de picături de 2–3 mm în diametru. Acest balsam formează baza și esența propolisului, conform teoriei lansate în 1907 de către KÜSTENMACHER.

Din experiențele lui BRUNNING reiese că acest propolis de origine internă este folosit pentru spălarea celulelor fagurilor, îndeosebi a celor nou construite, înainte ca matca să depună puncta.

O altă ipoteză emisă în cazul originii propolisului este : Albinele colectează secrețiile răšinoase ale mugurilor și ramurilor tinere de plante numai în cazul insuficienței polenului floral, iar masa principală a propolisului este elaborată de albine ca produs secundar în timpul digerării polenului.

Se știe că învelișul polenului conține substanțe uleioase și balsamice, inclusiv rășini. Aceste substanțe feresc conținutul granulei de polen de alterare pe timp umed și în diferite condiții nefavorabile. Cind albinele prepară din polen hrana pentru larvele lor, ele separă partea nedigerabilă a polenului — substanțe balsamice, răšinoase, depunându-le sub forma unor picături de propolis pe care îl utilizează pentru nevoieștile stupului.

Probabil că albinele adună propolis atât printr-un procedeu cît și prin celălalt îmbogățind acest produs prin adăugarea unui ferment digestiv și supunându-l fermentației lactice, în organele lor digestive.

În timpul colectării și depozitării produsului albinele adaugă enzime cu anumite proprietăți antibiotice. Procesul formării propolisului este extrem de complicat, iar compoziția lui nu a fost total stabilită.

Se afirmă că cea mai mare parte a propolisului ar avea această origine internă și acest lucru este ușor de evidențiat prin examinare microscopică — analiza prin care se observă firele și grăuncioarele de polen pe care acesta le conține.

Pe baza teoriei lui KÜSTENMACHER, PHILIPP & WECK au fost efectuate numeroase cercetări. Principala obiecție adusă acestei teorii este faptul că structura proventriculului de la albină nu permite o separare a „balsamului“ de alte ingrediente ale polenului. În plus analiza polenului demonstrează că acesta nu conține compușii caracteristici și permanenți ai propolisului.

Un alt argument : albinele închise într-o seră și aprovisionate cu polen din abundență nu au depus nici un pic de propolis (MACGREGOR, 1952).

Trebuie de asemenea semnalat faptul că prezența urmelor și mai ales a învelișului polenului sănt elemente insuficiente pentru a demonstra originea internă, deoarece acestea sănt în mod frecvent prezente în analizele propolisului recoltat în exclusivitate de pe surse vegetale, care conțin în mare parte impurități și corpuri străine (fragmente de organe de albină, lemn, grăuncioare de polen, substanțe minerale date rate depunerilor de praf, etc.).

O ultimă dovadă frapantă reiese din cazul unei stupine situată într-un loc în care vegetația este predominant alcătuită din *Populus balsamifera*. Polenul acestei specii este recoltat primăvara, perioadă în care albinele îl consumă imediat, ori propolisul nu este recoltat de pe acest arbore decât la sfîrșitul sezonului. Se pare deci că cel puțin în acest caz propolisul nu provine din polen.

2. *Originea externă*. Tot la începutul secolului nostru au apărut o serie de teorii care afirmă originea externă a propolisului.

Necunoscindu-se prima ipoteză, în anul 1908 HELFENBERG menționa că albinele obțin propolisul de pe ramurile, lăstarii, frunzele și mugurii de mesteacăn, ulm, arin, etc., devreme ce compoziția acestuia variază.

În 1926 JAUBERT a izolat din propolis, chrizina, compusul responsabil pentru culoarea cerii de albine și acesta știa că propolisul este obținut din *Populus nigra*, varietatea *pyramidalis*.

Originea vegetală a propolisului a fost afirmată de către ROSCH în 1927 și din nou de către VANSELL și BISSON în anul 1940. Aceștia din urmă au examinat propolisul ca pe o substanță contaminantă a cerii de albine și au ajuns la concluzia că o serie de varietăți de propolis din vestul Statelor Unite își aveau originea în mugurii de plop (*Populus nigra*) și din alun (*Alnus viridis*).

JUNGKUNZ a făcut cercetări asupra fractiunii insolubile a propolisului și a găsit în aceasta grăuncioare de polen aparținând speciilor vegetale de *Lupinus*, *Robinia*, și *Onobrychis sativa*, și a stabilit că ceara din propolis este aparent de origine vegetală. Cu toate acestea el a afirmat că ceara din propolis este de origine încă necunoscută.

În mod general, se acceptă actualmente că albinele colectează propolisul din diferite surse vegetale din zonele temperate din nord. Principalele specii lemnoase producătoare de propolis sănt: plopul (*Populus spp.*) fag (*Betula spp.*), pinul (*Pinus spp.*) bradul (*Abies spp.*) prunul (*Prunus spp.*) salcia (*Salix spp.*), ulmul (*Ulmus spp.*), stejarul (*Quercus spp.*), castanul de India (*Aesculus hippocastanum L.*), frasinul (*Fraxinus excelsior L.*). Albinele vizitează probabil și alte specii pentru a recolta acest prețios material, dar acestea sănt de departe de a putea fi inventariate.

Se cunoaște foarte puțin despre aceste surse de propolis sau chiar și mai puțin despre sursele de propolis de la tropice. Există oarecare dovezi că în vestul Australiei, albinele pot obține propolis din specia *Xanthorrhaea*, plantă ce crește numai în această regiune a globului.

Faptul că propolisul este transformat de către albine rămâne încă un punct de dezbatere ce va fi discutat ulterior. Este suficient să men-

ționăm că un număr de compuși chimici prezenti în acești arbori din care albinele colectează propolisul se găsesc neschimbați după ce aparent albinele îl au folosit. Totuși, propolisul găsit în stup nu are același aspect același consistență și nici același miros ca și răsinile vegetale recoltate de albini și examineate după capturarea albinelor din zbor; acestea nu îl recoltează deci ca pe un produs finit și este posibil că albinele îl adaugă o serie de secreții salivare sau enzime, în același mod în care o fac pentru miere. Se pune deci încă în discuție problema unei eventuale modificări sau transformări de natură chimică a acestui material.

Desigur nu se poate contesta prima origine — cea internă — dar se știe din practica apicolă că stupii amplasati lîngă sau în păduri, propolizează mult mai mult decât cei situați în zonele de cîmpie.

In orice caz, chiar dacă teoriile lui KÜSTENMACHER, PHILIPP & WECK ar putea fi verificate, aportul propolisului nu va constitui decât un punct pentru a ajusta și a face mai importantă producția vegetală. Pentru a determina în mod definitiv originea propolisului trebuie să încă întreprinse multe cercetări pentru a da o interpretare precisă asupra modului său de elaborare.

## COLECTAREA PROPOLISULUI DE CĂTRE ALBINE

Așa cum am menționat albinele găsesc surse de propolis pe frunze, mugurii și scoarța coniferelor, plopilor, prunilor și a altor plante ce secretează substanțe răsinoase.

Mulți dintre cercetătorii care au urmărit activitatea albinelor în colectarea de propolis au observat în detaliu modul cum lucrează. Unul dintre aceștia a fost cercetătoarea germană WALTRAUD MEYER (Bee World, 1956).

CATTORINI (1963) — descrie cu claritate colectarea propolisului de pe plopi; mugurii de plopi care s-au dezvoltat pe ramuri, timpuriu în luna martie, atrag culegătoarele de propolis. Albinele sfârîmă în bucațele exudatului (secreția) rășinos de pe muguri, folosindu-se de picioarele de dinapoi și de componentele aparatului bucal. Bucătelele sunt umectate cu limba și formate cu ajutorul mandibulelor. Cu ajutorul picioarelor, albinele preiau bucațelele de propolis din gură, de-a lungul perișorilor de pe tibia și îl depun în interiorul corbiculelor (coșulețele de polen); indentația fără perișori de pe fața exterioară a tibiei posterioare. În timp ce pune o particulă de propolis în interiorul corbiculei, albina caută din nou propolis. Mișcările foarte rapide ale picioarelor implicate în acest procedeu au fost ilustrate de către WALTRAUD MEYER (1956).

O altă descriere a modului în care albina colectează propolisul este următoarea: după ce s-a folosit de antene pentru a descoperi particula cea mai potrivită, culegătoarea de propolis atacă substanța răsinoasă cu mandibulele. Apoi cu capul ridicat ea se trage înapoi pînă ce particula de propolis pe care a apucat-o se întinde, transformîndu-se într-o ată

lungă și se rupe. După aceea, picioarele ei manevrează mica particulă de răsină și o depozitează într-unul din coșulețele de polen (corbicule). Este uimitoare dexteritatea cu care albinele manevrează acest material lipicios fără a se încleia. Este clar că albina secretă o anumită substanță sau o serie de substanțe care o ajută să facă față acestei situații.

„Ațele“ de propolis sunt îndepărtate de pe mandibule cu ajutorul cîrligelor celei de-a doua perechi de picioare și apoi manevrate către înapoi și depozitată în corbicule. Cu suprafața internă (interioară) a metatarsurilor celei de-a doua perechi de picioare, firul de răsină este acum apăsat, împins în poziția adecvată și modelat la forma unui ghemotoc de polen. Această operațiune este repetată de mai multe ori pînă ce o picătură de propolis destul de mare, aderă la fiecare corbiculă. După fiecare smulgere și depozitare a firului de propolis, culegătoarele își iau zborul pentru puțin timp, întorcîndu-se la locul original după cîteva secunde și continuă încărcarea cu propolis.

Timpul necesar unei culegătoare pentru a acumula o încărcătură de material (propolis) variază mult în funcție de condiția acestuia și de facilitatea cu care își realizează încărcătura. MEYER a observat că albinele culegătoare de propolis își întrerup adeseori operația de încărcare, întorcîndu-se la cuib și revenind din nou la cules fără ca încărcătura să se fi micșorat. Se presupune că în acest caz, scopul acestor curse este aprovisionarea cu hrana. Se apreciază că zborurile pe care culegătoarele de propolis le fac spre cuib și înapoi durează în medie 15—20 minute. Aceste curse de întrerupere au loc la intervale de 5 minute pînă la 1 oră.

Cînd coșulețele de polen (corbiculele) sunt umplute, albinele duc în final încărcătura de propolis în stup. Ele pot aștepta pe peretele stulpui — înregistrările au variat între 1 oră și 2 zile — înainte ca încărcătura de propolis să fie îndepărtată de către albine, ce îl utilizează imediat. Aceste albine erau mai în vîrstă decît cele ce construiesc fagurele și căpăcesc celulele cu miere; la aceste albine glandele ceriere sunt în mare măsură atrofiate.

La întoarcerea în stup, culegătoarea de propolis nu se dispensează de încărcătură niciodată singură. Albinele din stup trag picăturile de propolis cu mandibulele lor în același mod în care albina culegătoare trage firele de răsină de pe scoarța arborilor. Se pare că este o muncă foarte grea și se depune un efort enorm atât de către culegătoarea de propolis cît și de către albinele care efectuează descărcarea. Albinele se țin ferm cu piciorușele lor pe suprafața de sprijin în timp ce mandibulele le sunt cufundate în propolis. Ele trag cu atită efort încit adeseori culegătoarea nu reușește să se mențină și este îndepărtată din poziția sa.

Destul de frecvent culegătoarele de propolis nu intră în stup ci sunt eliberate de sarcina lor în afara stulpului, pe placa de zbor. În timpul acestui proces de îndepărtare a propolisului se întimplă adeseori că bucatele mici sau chiar încărcături întregi să cadă accidental și se lipesc de diferite porțiuni pe stup. Totuși, albinele nu par a face efortul de a-l îndepărta. Aceasta este explicația prezenței multor picături de propolis colorat, transparent care se pare că nu prezintă un scop particular.

După obținerea propolisului albinele din stup îl transportă cu mandibulele lor la locul unde este necesar și îl aplică în acel loc prin utilizarea mandibulelor.

Limba nu este utilizată nici la colectare și nici la aplicarea propolisului.

Temperatura pare să joace un rol important în procesul de colectare a propolisului. Temperaturile ridicate înmoiaze întotdeauna substanțele ceroase și răšinoase, făcindu-le mai plastice și desigur mai ușor de adunat și manevrat.

Aceasta este explicația parțială pentru cantitatea mare de propolis depozitată în sezonul cald. Culegătoarele de propolis nu sunt văzute dimineață devreme. Apar mai întâi în jurul orelor 10.00 a.m., și odată cu trecerea timpului numărul lor crește foarte mult. Către seară în stup vin mai puține încărcături de propolis.

Uneori seara, albinele pot fi observate cu puțin propolis aderent de picioare. La aceste albine, unul sau ambele picioare poartă o prominență constând din propolis ce se întărește în timp ce este îndepărtat. Astfel de albine au fost însemnate pentru a afla soarta acestor bastonașe de propolis. Albinele marcate în astfel de ocazii nu se alătură formelor din cîmp în dimineață următoare, ci rămân inactive pe scindura de zbor, însorindu-se. Mai tîrziu, în cursul zilei spre amiază, ele apar libere de apendicele lor lipicioase și zboară înapoi la activitatea lor.

Se pare că lumina soarelui ajută la reînmuierea propolisului întărit pentru a face posibilă îndepărtarea acestuia.

## RECOLTAREA PROPOLISULUI

Propolisul omogen, destinat valorificării, se recoltează în sezonul activ, adică la sfîrșitul perioadei de înmugurire a fiecarei specii de plante sau a grupului de plante cu o anumită specificitate vegetativă, localizate în aceeași microzonă pedoclimatică.

Originea botanică și geografică a propolisului influențează atît compoziția chimică, cit și efectele farmacologice.

Pentru obținerea de propolis monogen este indicată transportarea familiilor de albine în zona cu specia de plante propolifere, adică producătoare de propolis. Deoarece propolisul monofit se utilizează mai mult în scopuri farmaceutice.

S.A. Popravko, în lucrarea sa „Compoziția chimică a propolisului“, originea lui și problemele standardizării, arată că a reușit să obțină din extractele alcoolice din muguri de mesteacăn (*Betula verrucosa*), aceleași componente în aceeași concentrație ca din propolisul de mesteacăn. În ceea ce privește alte componente încă neidentificate din propolisul de tipul indicat și din secrețiile de mesteacăn — apreciind după mobilitatea lor cromatografică, acestea sunt de asemenea identice. În condițiile unei compozиii chimice controlate și efectele terapeutice ale propolisului sunt repetabile.

Recoltarea propolisului se va efectua în condiții stricte de igienă prin folosirea de utilaje specifice — colectoare de propolis cu grile, grătar și texturi speciale. Propolisul obișnuit (polifit), destinat nevoilor industrii, se recoltează în toată perioada sezonului activ, prin răzuirea acestuia de pe părțile componente ale stupului și prin folosirea colectoarelor de propolis.

Răzuirea propolisului se execută cu dalta, cu ajutorul unui cuțit sau cu racleți, având grijă să se obțină un propolis cît mai curat fără impurități. Recoltarea se face de obicei cu ocazia controlului stupilor sau la fiecare perioadă de 15—20 zile, cînd temperatura mediului ambiant este de cel puțin 20°C.

Apicultorii au inventat o serie de soluții tehnice simple și eficace pentru a forța albinele să propolizeze mai mult. Astfel pentru mărirea producției de propolis se recomandă lărgirea distanțelor dintre rame, între scindurilele de podisori la stupii orizontali sau distanțarea podisorului stupului vertical cu ajutorul unor bețe de chibrit care creează mici spații, pe care albinele le blochează cu propolis. După fiecare recoltare a propolisului, albinele propolizează din nou aceste spații.

## COLECTORUL DE PROPOLIS

Colectorul de propolis este utilizat în apicultură pentru obținerea unei cantități mai mari și cu un conținut redus de impurități a acestuia.

După îndepărțarea podisorului, colectorul se așează în stup pe spetezele superioare ale ramelor, deasupra familiei de albine. În timpul folosirii colectorului de propolis nu se mai pune podisorul. Colectorul de propolis are o construcție modulară și poate fi utilizat la toate tipurile de stupi fabricați în țara noastră, stimulînd familia de albine, să producă mai mult propolis. Detaliile tehnice de construcție ale colectorului de propolis sunt prevăzute în norma internă 63/1980.

Părțile componente ale colectorului de propolis sunt : grătarul lamelar, țesătura din material plastic și pînza superioară ; aceste piese se livrează într-o pungă de polistiren. Grătarul lamelar este format din 5 lame longitudinale, unite între ele prin 4 lame transversale. Lamela longitudinală trebuie să fie perfect plană. Lamela transversală se execută și ea din tablă prin debitare, urmată de presare în matriță. Grătarul lameelor se asamblează într-un dispozitiv special ; sudarea lameelor transversale se face prin punctare, două cîte două, așezate față în față. Asamblarea trebuie să asigure rigidizarea sistemului.

Pe acest grătar, așezat în stup pe spetezele superioare ale ramelor, se pune țesătura din material plastic iar peste aceasta o pînza de aceeași dimensiuni ( $400 \times 480$  mm) realizîndu-se în acest fel o izolare incompletă pentru familia de albine.

Prin acest sistem se permite circulația liberă a albinelor pe spetezele superioare ale ramelor, pentru ca ele să poată astupa cu propolis găurile din țesătura de material plastic încercînd să izoleze mai bine cuibul. Propolisul depus trece prin ochiurile țesăturii de material plastic și se lipește de pînza. Periodic, în interval de cîteva zile, se desprind

cele două folii una de alta, pentru a se scoate propolisul din ochiurile ţesăturii de material plastic. În acest fel se ajunge la un strat din ce în ce mai gros de propolis înmagazinat în pînză, care la recoltare poate atinge 200—300 g. Astfel se recoltează un propolis pur, care se desprinde de pe pînză prin refrigerare în congelator și apoi prin fărîmițare. Propolisul fiind tare și sticlos la rece, se desprinde ușor, operația recomandându-se a se face deasupra unei tăvi de unde se adună ușor.

Unii apicultori au recurs la un colector de propolis modificat, prin utilizarea unui podisor de linoleum cu suport textil. Partea lucioasă este aplicată peste familia de albine direct pe spetezele rameelor, iar propolisul depus se răzuiește mai ușor și se obține un propolis de o puritate perfectă.

Apicultorii care folosesc colectoarele de propolis corect și care acordă atenția cuvenită răzuirii lui periodic în tot timpul sezonului activ, au reușit să realizeze cîte 300 g propolis în medie de la fiecare stup, ceea ce înseamnă aproape 4 unități convenționale miere (1 kg propolis = 13 unități convenționale miere), rentabilizînd și în acest fel stupina.

## CONDIȚIONAREA, PĂSTRAREA ȘI RECEPȚIA PROPOLISULUI

Condiționarea propolisului are o mare importanță pentru păstrarea purității și menținerea proprietăților sale fizico-chimice, fiind și în modul conservării necorespunzător și învechit piedre din calitatele sale terapeutice. În acest scop este necesar să se eliminate corpurile străine din propolis: așchii de lemn, părți din corpul albinelor, hîrtii sau alte corpuri străine. Propolisul se păstrează sub formă de mici bulgări — fiind contraindicat procedeul unor apicultori de a-l uniformiza sau a îmbunătăți aspectul comercial prin topire sau comprimare prin încălzire, deoarece în felul acesta se pierde o bună parte din substanțele volatile și se degradează valoarea lui biologică.

Propolisul recoltat se va păstra în mici bulgări sferici ce se formează, încă de la recoltare, înveliți în hîrtie de staniol sau în pungi de material pastilic, introduși apoi în lădițe bine căptușite cu hîrtie cerată și păstrați într-un loc răcoros. Se mai recomandă a se păstra în borcane de sticlă colorată închise cu dop de sticlă, rodate și parafinate apoi. Propolisul trebuie să fie ferit de umezeală și de expunerea directă la razele soarelui sau a altor surse de căldură. Se recomandă păstrarea propolisului la temperatura de maximum 20°C, în încăperi aerisite, lipsite de umezeală și mirosluri străine.

Ambalarea, transportul și livrarea propolisului se face în pungi de plastic, introduse în lădițe de lemn, cu o capacitate de 5—20 kg.

Recepția propolisului se face organoleptic, conform prevederilor caietului de sarcini, în prezența producătorului. În caz că se constată corpuri străine, ca : așchii de lemn, pămînt, nisip, resturi vegetale, rosături de faguri, părți din corpul albinelor, insecte sau alte impurități, produsul se va refuza fără a se mai face examen de laborator. În caz de dubiu cu privire la calitatea produsului, se pot executa la un laborator autorizat, una sau toate analizele fizico-chimice, după natura dubiului ce există. Proba pentru analiză va fi recoltată cu ajutorul unui burghiu, din mijlocul blocului de propolis. Se recoltează din mai multe blocuri de propolis o probă medie de 100 g ce se împarte în două părți egale și se ambalează în flacoane care se parafinează și sigilează. Una din aceste probe se trimite laboratorului oficial, iar a doua se păstrează pentru o eventuală contraexpertiză.

## Capitolul II

# ASPECTE ECONOMICE ALE RECOLTĂRII PROPOLISULUI

TEHNOLOGIA EXPLOATĂRII FAMILILOR DE ALBINE  
PENTRU PROducțIA DE PROPOLIS

V. ALEXANDRU  
ROMANIA

Propolisul sau cleiul albinelor este o substanță cu o compoziție deosebit de complexă, care are la bază unele secrete ale mugurilor unor plante — plop, mestecăcan, cireș, vișin, prun, piersic, brad, anin, etc. la care albinele adaugă ceară, resturi de la ingerarea polenului etc.

Propolisul este folosit de albine pentru limitarea deschiderii urdinîșului, polizarea celulelor și a pereților stupilor, astuparea și nivelarea crăpăturilor, asperităților din stup, etc. Din această cauză, multă vreme propolisul a fost privit de apicultori ca un produs nedorit în stup, care îngreuna manipularea ramelor și a pieselor stupului, în selecția albinelor urmărindu-se și diminuarea și chiar reducerea totală a înșușirii de propolizare a albinelor.

Ca urmare, în prezent albina autohtonă românească (*Apis mellifica carpatica*) cunoscută în general ca rasă cu înșușiri slabe de propolizare, produce cantități foarte mici de propolis, în principal pentru fixarea ramelor și a pieselor componente ale stupilor, fără a mai delimita urdinîșul cu propolis sau a acumula propolisul în anumite locuri din stup ca în cazul raselor puternic propolizatoare cum sunt: albina neagră europeană (*Apis mellifica mellifica*) sau albina caucaziană (*Apis mellifica caucasica*).

În stup propolisul se prezintă ca o materie amorfă, lipicioasă, de culoare galben-verzui sau brună cu diferite nuanțe, cu aromă placută, caracteristică, asemănătoare mellisei. La temperaturi scăzute propolisul se întărește și devine sfărîmicioas, iar la temperaturi peste 35°C se înmoiează și devine deosebit de lipos.

Se topește la 65°C și se dizolvă bine în alcool eter și în cloroform. În terebentină se dizolvă mai greu.

Pentru culesul propolisului în familie se formează o grupă anume de culegătoare.

Producția de propolis are un profund aspect sezonier, cea mai mare cantitate fiind recoltată în perioada de toamnă cînd albinele își pregătesc cuibul de iernare.

În perioadele de cules, albinele aproape nu strîng propolis, în schimb, în perioadele de lipsă a secrețiilor naturale albinele folosesc atât propolisul vechi din stup cît și rășini de altă origine, smoală, etc., de pe obiectele din jur.

Diversitatea mare de materii prime din care albinele formează propolisul îi dău o compoziție foarte heterogenă. Se consideră că în compoziția propolisului intră 50—55% rășini vegetale și 8—10% uleiuri eterice. De asemenea se mai adaugă o cantitate relativ mare de ceară pe care albinele o amestecă în propolis.

Din substanțele identificate în compoziția propolisului amintim: răsinile, flavonele, glucozide, diferenți acizi organici, elemente minerale ca: fosforul, potasiul, calciul, siliciul, manganul, etc.

Pe lîngă rolul de material de etanșare și blocare a crăpăturilor în stup propolisul aduce deosebite foloase familiei de albine prin proprietățile sale antibiotice, prin prezența sa anihilând acțiunea diferențiilor agenți patogeni introduși sau dezvoltați în stup. În acest scop albinele propolizează pereții celulelor cu un strat fin de propolis, creînd condiții propice de dezvoltare a puietului. De asemenea, în cazul pătrunderii în stup a unor dăunători: fluturi, șoareci, etc., după ce sînt omorîți aceștia sînt înveliți de albine cu un strat de propolis pentru a nu vicia aerul din stup în urma descompunerii lor.

Datorită conținutului de rășini vegetale propolisul este folosit de asemenea în industria lacurilor și a vopselelor, precum și în prepararea unor medicamente, ultimul aspect căpătînd în prezent o amploare din ce în ce mai largă. Din această cauză, producția de propolis are o importanță deosebită, fiind necesară elaborarea de noi metode și utilaje de producere a propolisului în cantități sporite.

### **Recoltarea și conservarea propolisului**

În condițiile țării noastre, în care albina autohtonă propolizează destul de slab, se pot totuși recolta ușor cca. 150—200 g/familie în funcție de zona de amplasare și de frecvența recoltării propolisului din stupi.

Pentru sporirea producției de propolis este necesară în primul rînd noua orientare privind obținerea și selecționarea materialului biologic cu tendințe de propolizare, precum și adaptarea unor dispozitive care să permită recoltarea propolisului în cantități mai mari și de calitate.

Pe această linie propolisul poate fi obținut prin:

a) recoltarea de pe piesele stupilor: de la urdinis, de pe pereții stupilor, de pe distanțatoarele rameelor, de pe scîndurelele de podișor, etc. Recoltarea se face prin răzuirea atentă a pieselor respective, astfel

încit să se obțină propolisul cît mai curat posibil, fără amestec de impurități cum ar fi : aşchii de lemn, albine moarte, resturi de la turtele de șerbet, etc. De asemenea, se va evita înglobarea în propolis a cresătărilor de ceară ce se pot întâlni în zonele de depunere a propolisului.

b) folosirea unor dispozitive special adaptate cum ar fi : plase din fire de plastic sau metalice cu ochiurile de 1—2 mm, gratii din șipci de lemn, plastic sau firme metalice cu secțiune rotundă sau dreptunghiulară, plăci de lemn cu suprafață aspră, plăci de plastic cu orificii de 2—3 mm, etc.

La amplasarea în stupi a dispozitivelor de producere a propolisului se va avea în vedere ca acestea să prezinte pe cît posibil suprafețe ne-regulate (neșlefuite), spațiile (orificii, crăpături, distanțe) dintre piesele componente ale dispozitivelor și ramele sau piesele stupilor să nu pășească 3 mm.

Dispozitivele se dimensionează astfel încit să acopere o suprafață cît mai mare în stup și se montează direct peste leațurile superioare ale ramelor. Se pot folosi atât prin suprimarea podișoarelor cît și în prezența acestora, activitatea de propolizare fiind determinată îndeosebi de caracteristicile de rasă cît și de zona de amplasare. În acest sens, în zonele mai reci sau în zonele cu păduri, tendința de propolizare este mai mare decât în zonele de cîmpie.

O metodă cu randament sporit este înlocuirea scîndurilor de podișor sau a podișoarelor tip planșetă cu o plasă de nylon cu ochiul de 1,5—2 mm peste care se întinde o pînză de sac. Pentru protejarea cui-bului de curentii de aer care trec prin acest nou tip de podișor albinele caută să umple spațiile dintre plasă și pînză și să încarce ochiurile plasei cu propolis. Prin detașarea periodică a plasei de pînză se sporește cantitatea de propolis depusă. Recoltarea propolisului de pe pînze se face prin menținerea acestora la rece (în frigider sau la o temperatură sub 5—6°C) după care prin simplă frecare propolisul se detașează foarte ușor de pe pînze.

Producerea propolisului se poate face în tot decursul sezonului activ și în special în perioadele de primăvară și de toamnă, cînd recoltarea propolisului din natură de către albine este mai intensă.

Recoltarea propolisului atât de pe piesele stupilor cît și de pe dispozitivele folosite se face după caz cu ajutorul daltei apicole cît și cu ajutorul frigului ; propolisul de pe piesele mobile (plase, folii, pînze, etc.) putînd fi ușor recoltat după congelare prin simplă frecare sau îndoire a dispozitivului respectiv.

Păstrarea propolisului se face prin compactizarea în bulgări de anumite dimensiuni (10—20 cm diametru), în locuri uscate, bine aerisite, la temperatura camerei, în pungi de plastic, astfel încit să-și mențină timp cît mai îndelungat aspectul proaspăt și să se evite pierderea substanțelor volatile din compoziție.

## SĂ RECOMANDĂM APICULTORILOR SĂ RECOLTEZE POLIS

Th. JACHIMOWICZ  
AUSTRIA

Cînd punem problema rentabilității recoltării propolisului, trebuie mai întîi să analizăm aspectul calitativ și cantitativ al recoltării acestui produs secundar al stupinei.

Problema calității propolisului cuprinde originea și proprietățile acestuia.

Propolisul, este un material de construcție al albinelor pe care acestea îl folosesc pentru asigurarea climatului interior corespunzător în stup, pentru conservarea pereților interiori, pentru consolidarea și cătușirea celulelor fagurilor. Știm că albinele izolează cu un strat de propolis cadavrele animalelor care au pătruns în stup (șoareci, fluturi cap-de-mort).

Din punct de vedere al originii, propolisul este un amestec de componente diferite în cantități diferite. Principala sa componentă o constituie răsinile care acoperă frunzulîtele mugurilor de plop, mesteacăn, stejar, castan sălbatic și ai multor copaci, mai ales ai răshinoaselor. Aceste substanțe sunt recoltate de culegătoare în special la sfîrșitul verii și toamna și transportate pe piciorușe la fel ca polenul. În stup, acest material este preluat de albinele clăditoare care după ce îl prelucrează cu ajutorul mandibulelor îl depun acolo unde este necesar.

Este foarte posibil ca în procesul acestei prelucrări în propolis să ajungă secretei mandibulare, eventual ale glandelor labiale, cum se întîmplă și la prelucrarea cerii — pentru ca să poată fi amestecată bine. În afară de aceasta, propolisul cuprinde și balsam de polen — stratul uleios protector al grăuncioarelor de polen care se elimină în gușa albinelor. Așa se face că propolisul conține aproape întotdeauna și ceară în diferite proporții.

Din această caracterizare a propolisului reiese că compoziția lui variază în funcție de specile de plante vizitate de albine, deci de vegetația din jurul vîtrei. Cantitatea de propolis recoltat depinde de caracteristicile locului de amplasare a albinelor și de condițiile climatice.

Afirmăția repetată adesea că chituirea intensă și îngustarea urdinîșului de către albine prevăstesc o iarnă lungă și grea s-a dovedit a fi foarte des nejustificată. Cert este însă că îngustarea urdinîșului prin chituire s-a observat numai în zone cu climă aspră; în timp ce de exemplu la Viena, albinele niciodată nu reduc nici chiar urdinîșurile foarte mari ale stupilor din plastic.

Din modul de folosire a propolisului de către albine reies două calități ale acestui material: este un material de construcție care izolează apa, și un mijloc de conservare cu caracter antimicrobian. Materialul prezintă interes tocmai pentru această ultimă proprietate. Încă din Evul Mediu propolisul se folosea în tratamentul bolilor, iar calitatea lui de conservant, după cum știm, o cunoșteau și vechii meșteri lutieri.

În ultimul timp se redescoperă aceste proprietăți ale propolisului și se cercetează în mod științific. Pornind de la lucrările de bază ale lui

BARBIER, GONNET, LAVIE și VILLANUEVA din Franța cu privire la efectul antimicrobian al flavonoidelor, fracțiuni ale propolisului, PO-PRAVKO și colaboratorii lui din Uniunea Sovietică au extins aceste cercetări la bacterii și ciuperci. Prin dizolvarea propolisului în alcool s-au identificat în el substanțe biologic active.

Preparatele pe bază de propolis se experimentează cu succes în numeroase clinici, de exemplu în România și în Uniunea Sovietică, pentru tratarea unor serii de boli bacteriene, micotice și virale. Este posibil însă ca aria de folosire a preparatelor pe bază de propolis în medicina umană și veterinară să se mai lărgească.

Propolisul s-a dovedit a fi un bun mijloc de conservare antibacteriană pentru lemn, fără a mai menționa folosirea lui la lustruirea viorilor. Am folosit încă de acum cîțiva ani extractul în acetona, pentru impregnarea pereților exteriori ai stupilor noi. Substanța pătrunde adinc în lemn. Stupii așezăți sub cerul liber rezistă mai bine la intemperii decît cu alte mijloace de protejare.

Folosirea propolisului în scopuri medicinale și tehnice depinde de următoarele condiții :

În primul rînd, de livrarea regulată a materiei prime — care depinde de metodele de obținere și de condițiile climatice.

Produsul, cu un conținut minim de ceară, se poate obține prin crearea intenționată în stup a unor spații suplimentare de aproximativ 1—2 mm. Alte tipuri de chituire dau un propolis cu un conținut mai ridicat de ceară, pe care putem să o separăm de propolis prin topirea cu grijă la o temperatură de aproximativ 80°C.

Obținerea dirijată a propolisului se limitează la acele teritorii care avînd o climă aspră le obligă pe albine să intensifice acumularea de propolis.

A doua condiție pentru folosirea propolisului mai ales în scopuri terapeutice este standardizarea sa sub raportul activității biologice contra diferitelor sau a tuturor tulpinilor de microorganisme patogene. Numai după aceea propolisul, produs de origine diversă și deci cu compoziție variată, va putea fi prelucrat în preparate cu eficiență uniformă, constantă.

Odată îndeplinite aceste condiții, nu este exclus ca prin recoltarea propolisului creșterea albinelor să devină o nouă sursă de venituri pentru apicultori.

## METODELE DE OBȚINERE A PROPOLISULUI

P. KRUPIČKA  
CEHOSLOVACIA

Condiția principală pentru a utiliza propolisul în anumite domenii este obținerea unei cantități suficiente de propolis de origine cunoscută.

Practica apicolă contemporană cunoaște propolisul în primul rînd ca pe o substanță care îngreunează manipularea ramelor, murdărește mîinile, îmbrăcămintea, uneltele și provoacă uneori alergii. Propolisul se

înlătură de pe rame și părțile componente ale stupului numai cind se intenționează a fi folosit în pregătirea lacurilor. Cind se amestecă din nebăgare de seamă în ceară, îi strică calitatea și fagurii artificiale se strică și se rup.

Prin aplicarea unei tehnici corespunzătoare, într-un stup mic se adună de obicei chiar o mare cantitate de propolis. Colectarea lui este de cele mai multe ori întâmplătoare, nesistemerică, primitivă și dificilă. Materia primă obținută este impură.

Institutul de cercetări apicole din Dol studiază posibilitățile sistematice de folosire a tuturor produselor apicole; dată fiind nevoie sporită de propolis, Institutul a reînnoit — în colaborare cu Centrul pentru invenții și propuneri de îmbunătățiri — propunerea de a elabora „Metode de obținere o propolisului“.

Pentru a face față programului larg de cercetare a compozиiei, efectului și întrebunțării propolisului, specialiștii au sarcina de a aprofunda și preciza cunoștințele din domeniul apiculturii care creează posibilitatea obținerii propolisului de calitate corespunzătoare și în cantitate mare. Considerăm potrivită orientarea muncii specialiștilor în apicultură astfel :

(1) strîngerea și aprofundarea cunoștințelor despre originea componentelor propolisului, despre modul de recoltare și depozitare în stup de către albine ;

(2) strîngerea și aprofundarea cunoștințelor despre participarea glandelor albinelor la culegere, depunere, prelucrarea și folosirea propolisului ;

(3) valorificarea cunoștințelor despre instinctul de propolizare al albinelor în sensul creării condițiilor care să stimuleze albinele de a acumula o mare cantitate de propolis în anumite locuri din stup, eventual în instalații speciale, care ar îlesni recoltarea igienică și cu ușurință a propolisului ;

(4) punerea la punct a unei tehnologii de obținere a unei producții mai mari de propolis, folosindu-se însușirile de rasă ale albinelor meline și prin selecție specializată ;

(5) propagandă și asigurarea colectării și achiziționării organizate a propolisului de la apicultorii cu experiență, la un preț stimulator ;

(6) pe baza progreselor cercetării temeinice a propolisului și ținind seama de cerințele deosebite legate de omologarea efectelor lui, să se elaboreze metode speciale de recoltare a propolisului cu anumite proprietăți, în regiunile și perioadele potrivite ;

(7) elaborarea unei metode de obținere, eventual de separare a propolisului de ceară care îl impurifică ;

(8) elaborarea unor metode corespunzătoare de prelucrare a propolisului brut în funcție de destinația lui.

Problema principală rămîne căutarea și perfecționarea metodelor de exploatare a propolisului. În prezent obținem propolis prin raclarea lui de pe rame, din goluri, de pe podișoare, spetezele ramelor, mai rar din depunerile în apropierea urdinîșului. Încercările de folosire dirijată a instinctului de propolizare au constat pînă acum în îndepărtarea scîndurilor de podișor și introducerea unor grătii din sîrmă sau material

plastic, sau în săparea unor adâncituri în lemnul ramelor și al celor-lalte părți ale stupului. În experiențele noastre ne străduim să reținem propolisul în ochiurile dintre firele de material plastic, de unde recoltarea s-ar face mai ușor și mai igienic, prin scoaterea din ramă. Trebuie menționat că în experiență au apărut dificultăți datorate propoli-zării mai reduse decât înainte, ceea ce se explică prin trecerea stupinei institutului pe albine carnioliene, sușă Troisek.

Permiteți-mi să prezint cîteva cunoștințe și păreri, pe care avînd în vedere cerințele indicate le consider ca importante pentru evoluția metodelor de producere a propolisului.

1. Descrierea genială a lui LANGSTROTH, care în anul 1851 determină spațiul pe care albinele nu îl umplu cu propolis și nici cu ceară, o distanță de 3/—3/16 degete, adică 4,7625—9,5250 mm, este și astăzi sursă de inspirație și de noi descoperiri. Spații mai mici, printre care albinele nu pot trece, sunt de regulă astupate pretutindeni în stup, printre altele, cu propolis. Este nevoie de o precizare: la ora actuală considerăm ca distanță limită 4,5—4,8 eventual 5 mm. Nu cunoaștem pînă la ce adâncime este depus propolisul în spațiile înguste.

Este foarte posibil ca spațiul și adâncimea de umplere cu propolis să depindă de latitudinea geografică.

2. Explicarea propoli-zării prin tendonă albinelor de apărare contra frigului, a rafalelor de vînt și a curentului este, cel puțin în unele cazuri, greșită. Mai acceptabilă pare presupunerea unei apărări împotriva dăunătorilor și intrușilor prin umplerea spațiilor în care albina nu poate pătrunde și prin crearea unor valuri de apărare în dreptul urdinîșului. Instinctul de propolizare se manifestă însă într-o măsură mai mică sau mai mare pe toate obiectele din stup, inclusiv fagurii și diafragmele. Este foarte posibil ca pînă în prezent să nu cunoaștem precis și complet adevăratul motiv.

3. Sursele naturale de propolis sunt împărțite în două grupe diferențite esențial: prima grupă o constituie substanțele răsinoase, provenite în majoritate de pe mugurii de plante, pe care albinele le adună cu ajutorul mandibulelor și le transportă în coșulețele de pe piciorușele posterioare. Ca surse se menționează plopul (*Populus*), castanul sălbatic (*Aesculus hippocastanum*), mesteacănul (*Betula*), alunul (*Alnus*), molidul (*Picea*), pinul (*Pinus*), frasinul (*Fraxinus*), cireșul (*Prunus avium*), prunul (*Prunus domestica*), bradul (*Abies*), floarea-soarelui (*Helianthus*), salcia (*Salix*), ulmul (*Ulmus*), stejarul (*Quercus*).

Grupa a doua o formează balsamul din polen eliberat (în timpul crăpării și digerării grăuncioarelor de polen de plante entomofile) din învelișul acestuia și care, împins de valvulele proventriculului, se acumulează în gușă. Balsamul este întins de albine cu ajutorul limbii pe obiectele din imediata apropiere a puietului. În timpul prelucrării acestor rășini cu ajutorul mandibulelor, mai intervine și secreția glandelor mandibulare ale albinelor lucrătoare. Colorarea puternică în galben a unor glande faringiene la albine lucrătoare hrânite experimental cu albumină confirmă posibilitatea participării glandelor la colorarea suprafeței obiectelor din stup.

4. Bogăția și originea diferită a numeroaselor surse ale componentelor propolisului multiplică considerabil variantele posibile ale compoziției și prin aceasta și variațiile de acțiune a propolisului, astfel că niște tipuri standard se vor putea obține numai printr-o recoltare foarte minuțios organizată. Mai trebuie rezolvată și transportarea și amestecarea propolisului mai vechi cu cel proaspăt. Toate acestea ne permit să înțelegem dificultățile legate de îndeplinirea cerințelor impuse de standardizarea conținutului substanțelor eficace de tipul dorit.

5. Propolisul și ceară se găsesc foarte rar în formă pură pentru că la propolizare albinele înlocuiesc propolisul cu ceară. De aici decurge o impurificare a propolisului, în procente variabile cu ceară. Metode adecvate de separare permit obținerea unei céri de bună calitate și a unui propolis mai concentrat.

6. Părerile sunt împărțite asupra participării balsamului de polen alături de substanțele răšinoase în formarea propolisului existent în stup. Se obiectază că albinele propolizează mai ales în august, septembrie și octombrie, deci după încheierea perioadei celei mai mari producții de polen. De asemenea, se consideră îndoilenică posibilitatea de formare a unui fond mai mare de propolis din cantitățile mai mici aduse în ghemotoace. Sunt experiențe ce urmăresc propolizarea la coloniile de albine așezate în cuști de zbor. Prin experiențe asemănătoare McGREGOR a constatat în anul 1952 incapacitatea albinelor de a aduna propolis în cazul lipsei polenului în hrana; eu consider balsamul de polen parte componentă a propolisului.

7. Unica sursă pe care am consultat-o se referea la recolta medie anuală de propolis a 5 colonii de albine și anume aproximativ 65 g/colonie (fără a specifica rasa). Dispersarea propolisului în tot stupul limitează bineînțeles recoltarea lui.

Ca factori care limitează aducerea încărcăturilor de propolis putem menționa :

- a) numărul mic de culegătoare constante de propolis (numai cîteva zeci într-o colonie);
- b) suprimarea recoltărilor de propolis în timpul culesurilor intense;
- c) întreruperile dese ale prelucrării propolisului prin întoarcerile în stup ale culegătoarelor;
- d) imposibilitatea de a se elibera de ghemotoace fără ajutorul altor albine sau fără scăderea temperaturii;
- e) limitarea recoltării și depozitării propolisului prin oscilațiile de temperatură ambientă.

8. Ca înlocuitori ai răsinilor pot să servească unele materiale mai puțin obișnuite ca : smoală, asfalt, lichid folosit la impregnarea lemnului, ceară de altoit, vopsele uleioase, ceruri vegetale și ceruri artificiale.

9. În R.S. Cehoslovacă este răspîndită albina carnica *A. m. carnica*, care propolizează puțin; mai mult propolizează albina noastră autohtonă. O propolizare mai intensă s-a remarcat și în condițiile noastre, la albina caucaziană *A. m. caucasica*, mai ales prin depunerি neobișnuit de întinse pe părțile laterale ale stupului de tip Morav universal. Si albinele africane — albina de Madagascar *A. m. unicolor* și albina punică *A. m. intermissa* — sunt considerate ca propolizînd deosebit de

abundent. În condițiile din Cehoslovacia exploatarea instinctului de polizare se va face în însuși procesul de înmulțire planificată a albinelor de rasă pură sau prin încrucișare; totodată va trebui să ne orientăm pe specializarea liniilor de albine pentru diverse surse de propolis.

Scopul prezentului articol a fost de a prezenta mai ales apicultrilor condițiile actuale ale producerii propolisului și de a arăta calea pentru obținerea acestuia în viitor în cantitățile și calitățile dorite.

Interesul pentru propolis va contribui la înțelegerea necesității de constituire a unei grupe de lucru permanente în care să fie reprezentate toate sectoarele care au tangență cu studiul propolisului și care să concentreze noile cunoștințe și să coordoneze cerințele diferitelor secțoare. Vom saluta cu bucurie orice propunere.

## DESPRE PRODUCȚIA PROPOLISULUI

A. P. MIZIS  
U. R. S. S.

Orientarea de bază a apiculturii din R.S.S. Letonă este polenizarea culturilor agricole, în special a semincerilor de trifoi roșu și producția de miere și ceară. În ultimii 10 ani, pe apicultrorii din această republică îi interesează din ce în ce mai mult lăptișorul de matcă, propolisul, polenul și păstura. Întrucât aceste produse au o pondere mică în producție, de producerea lor au început să se ocupe în special apicultrorii amatori și unii apicultrori din stupinele proprietate obștească. Producția și condiționarea acestor produse a fost coordonată de filiala Tessisk a Societății de horticultură și apicultură. Totodată au început cercetările cu privire la aplicarea acestor produse în medicină.

În prezent, în republică se produc cca. 30 kg lăptișor de matcă, 1700 kg polen, 100 kg păstură și cca. 3—3,5 tone de propolis. Grupa de producție a laboratorului experimental de pe lîngă filiala Tessisk a Societății de horticultură și apicultură produce 11 preparate din propolis, Direcția generală farmaceutică din cadrul Ministerului Sănătății al R.S.S. Letone produce trei feluri de preparate, iar Fabrica chimică din Clain este pe cale să dea în producție PROPOSOLUL.

Având în vedere interesul crescînd față de propolis și creșterea prețului de achiziție, producția acestuia sporește an de an.

Comisia de prețuri de pe lîngă Consiliul de Miniștri al R.S.S. Letone a stabilit prețul unui kg propolis de calitate superioară la 30 ruble, iar pentru 1 kg de calitate inferioară la 10,9 ruble.

Intr-o zi de muncă un apiculțor poate să strîngă 1—1,5 kg propolis. Potrivit normativelor noastre de retribuire a muncii, pentru fiecare kg de propolis un apiculțor primește între 3 și 5 ruble. Dat fiind volumul mic de producție nu a existat o preocupare pentru metode rentabile perfecționate de producere a propolisului.

În condițiile R.S.S. Letone albinele din rasa cenușie de munte caucasană, și anume populațiile megreliene, sunt bune producătoare de propolis.

În prezent propolisul se recoltează la noi prin următoarele metode :

(1) Curățarea de propolis a rameilor, stupilor și pînzelor de sub capac. Cu ocazia examinărilor cuibului, apiculțorul curăță regulat ramele și parțial stupul ; curăță vechiul stup la transvazarea coloniilor în stupi noi dezinfecții ; curăță ramele cu ocazia extracției mierii ; de două ori pe sezon curăță pînzele de sub capac. Metoda este foarte grea ; o folosesc în special apiculțorii amatori.

(2) Ajustarea umerașelor la ramele de cuib. Această metodă intensifică întrucîtva propolizarea ; propolisul depus se curăță regulat cu dalta, în timpul examinării cuibului.

(3) Schimbarea pînzei — pînză de cort sau fibre de polietilenă. În cursul unui an apiculțorii schimbă de 2 ori pînzele de sub capac. Aplicind această metodă se obține propolis de bună calitate.

(4) Folosirea unui grătar special. La propunerea apiculțorului LEIKART grătarele se fac din șipci din lemn de esență tare, cu dimensiunea  $4 \times 6$  mm, cu distanță între ele 3—4 mm. În fiecare colonie sunt 2—3 grătare, care se schimbă regulat : se curăță în timpul liber. În practică, aceste metode se combină.

Analizând productivitatea coloniilor de albine pe baza producției de propolis s-au constatat următoarele : orice colonie, indiferent de rasa albinelor și de metoda de recoltare, poate da 50—100 g propolis ; cu albine cenușii caucaziene de munte se poate mări randamentul de propolis de 2—3 ori. Producția de propolis mai poate fi sporită cu ajutorul unei ventilații intense în cuibul de albine și prin perfecționarea metodelor de colectare. De asemenea, sistemul de retribuire a muncii pentru colectarea propolisului trebuie revizuit.

## CALITATEA PROPOLISULUI

T. V. VAHONINA

E. S. DUŠKOVA

U. R. S. S.

Odată cu amplificarea domeniilor și cu înmulțirea metodelor de folosire a propolisului a apărut și necesitatea controlului calității acestuia. La centrele de colectare trebuie să ajungă numai propolis de calitate superioară. Pînă în prezent nu există metode eficiente pentru efectuarea controlului corespunzător. Avînd în vedere că compoziția chimică a propolisului este prea puțin studiată, este greu de făcut o caracterizare a acestuia. În afară de aceasta, printre celelalte produse apicole, propolisul ocupă un loc deosebit — ca un sistem complicat cu multe componente, din care unele se modifică nu numai în funcție de răspîndirea geografică, ci și de sezon.

Lucrările de laborator efectuate la Institutul de cercetări pentru apicultură au stabilit că deși propolisul are o compoziție complexă, deseori variabilă, toate mostrele studiate conțin permanent un anumit grup de substanțe, care condiționează însușiri fizico-chimice

și biologice, inclusiv antimicrobiene, ceea ce deschide perspectiva analizării și caracterizării acestui produs.

Printre componentele permanente, prezente în toate mostrele, se remarcă compuși acizi și nesaturați. Indicele de iod este în medie 44,5  $\pm$  0,89, variind de la o moștră la alta în limitele 28,7—65,7. Pînă în prezent nu s-a stabilit natura compușilor nesaturați. Dar s-a constatat capacitatea propolisului, ca și a lăptișorului de matcă, de a se oxida cu permanganat de potasiu (T.V. VAHONINA). Se poate presupune că oxidarea propolisului este legată de prezența în compoziția acestuia a unor acizi nesaturați din seria grasă cu zece atomi de carbon, caracteristici organismului albinelor și secrețiilor glandulare, care pătrund atât în lăptișorul de matcă cât și în propolis.

Prin urmare, reacția cu permanganatul de potasiu permite nu numai caracterizarea calitativă a propolisului ci și a originalității produsului studiat.

S-a pus la punct o metodă de determinare a vitezei de oxidare a propolisului și a extractelor acestuia. Viteza de oxidare se exprimă prin timpul (secunde) în cursul căruia se decolarează o soluție de permanganat de potasiu 0,1 N într-un mediu care conține produsul cercetat.

Propolisul și extractele uscate de propolis — apos, alcoolic, eteric — decolarează soluția apoasă 0,1 N de permanganat de potasiu. Reacția este instantanee cînd soluția conține substanță uscată — 1 mg și mai mult extract alcoolic sau 0,1 mg și mai mult extract apos. Însușirea propolisului de a se oxida condiționează însușirile sale antioxidantă.

Determinarea vitezei de oxidare : 200 mg propolis pisat mărunt cîntărîte precis se pun într-un balon cu capacitate de 250 ml, se adaugă deasupra 5 ml alcool etilic rectificat. După o oră se adaugă în balon 100 ml apă distilată fiartă și răcită, amestecîndu-se cu grijă. Soluția se filtrează printr-un filtru de hîrtie. Într-un balon de 150 ml se introduc 10 ml filtrat peste care se adaugă 90 ml apă. Se iau cu pipeta 2 ml din soluția diluată, se pun într-un pahar de 50 ml, se adaugă 1 ml acid sulfuric 20% și se amestecă timp de un minut. În soluția acidulată se introduce o picătură (0,035—0,040 ml) soluție 0,1 N de permanganat de potasiu și cu cronometrul se urmărește dispariția culorii roz a soluției. Analiza se face la temperatură soluției de 18—20°.

Metoda de determinare a vitezei de oxidare a extractelor de propolis cu suspensie de 100 mg extract uscat este similară cu cea descrisă.

Pentru studierea vitezei de oxidare se folosesc de asemenea, extractele uscate de propolis — apos, alcoolic și eteric (T.V. VAHONINA, 1972).

Pentru toate produsele studiate, care conțin propolis substanță uscată pînă la 0,11 mg într-un ml soluție este caracteristică dispariția culorii roz în decurs de ceva mai mult de un minut (tabelul 1). Viteza reacției depinde de conținutul de substanță uscată din produsul cercetat în soluție. Soluția s-a decolorat în decurs de  $11,1 \pm 0,056$  sec — cînd soluția conținea 0,18 mg propolis substanță uscată. Dispariția culorii roz

era întărziată atunci cînd în soluție era mai puțin de 0,18 mg propolis substanță uscată. Uneori, cînd soluția conținea o cantitate dublă de substanță uscată, soluția se decolora instantaneu.

**Tabelul 1  
Oxidarea propolisului și a extractelor**

Materialul cercetat	Suspensia	Diluarea cu apă	Conținutul de substanță uscată (mg/ml soluție)	Timpul (sec.) de decolorare a 0,1 mg soluție de permanganat de potasiu (indice de oxidare)
Propolis	100	1 : 10	0,75	1,7 (imediat)
Propolis	100	1 : 20	0,40	1,7 (imediat)
Propolis	100	1 : 30	0,24	8,5
Propolis	200	1 : 100	0,18	11,1 ± 0,056
Propolis	100	1 : 60	0,11	70,0
Propolis	100	1 : 10	0,08	Nu se decolorează
Extract alcoolic	100	1 : 40	0,20	11,0 ± 0,68
Extract alcoolic	100	1 : 10	0,09	21,0
Extract alcoolic după inlăturarea extractului apos	100	1 : 10	0,09	6,16 ± 0,98
Extract în eter	100	1 : 10	0,11	Imediat
Extract în acetonă	100	1 : 10	0,10	Imediat
Extract apos	100	1 : 10	0,09	Imediat
Martor (mediu fără propolis)	—	—	—	Nu se decolorează

Cele mai active au fost extractele în eter, în acetonă, în alcool și în special extractul apos de propolis. Astfel, soluția de permanganat în mediul de extract apos de propolis, care conținea 0,09 mg substanță uscată într-un ml s-a decolorat imediat sau în decurs de 5,0—18,0 sec; cu 0,18—0,29 mg substanță uscată de propolis și extract alcoolic — în decurs de 11,0—11,1 sec.

Gradul de activitate al extractelor a depins de temperatura la care s-a făcut extractia (tabelul 2). Viteza de oxidare este mai mare pentru

**Viteza de oxidare a extractelor apease**

Localitatea unde s-a adunat propolisul din care se obține extractul	Temperatura de extractie (°C)	Timpul in care dispare culoarea roz (sec.)
Iaroslavl, biroul regional apicol	22	19,5 ± 0,5
	40	13,5 ± 0,5
	70	10,5 ± 0,6
	90	Imediat
Reg. Voronej, raionul Petropavlovsk, colhozul „Trud“	22	17,5 ± 0,6
	40	10,5 ± 0,6
	70	4,5 ± 0,6
	90	12,5 ± 0,6
Reg. Novosibirsk, raionul Cerepanovski, com. Murighino	22	15,5 ± 0,6
	40	6,5 ± 0,6
	70	9,5 ± 0,6
	90	12,5 ± 0,6

NOTA : suspensie de extract uscat — 100 mg, diluția — 1 : 10.

extractele apoase obținute la cald, și anume la 40°, 70° și 90°. Pentru extractele alcoolice după separarea fracției apoase s-a observat o dependență inversă — viteza de oxidare este mai mică pentru extractele alcoolice obținute la 70°C, în comparație cu extractele obținute la 22°C.

Deci partea de propolis solubil în apă se caracterizează prin calități superioare în comparație cu fracțiunile alcoolică, acetonică și eterică și de propolis inițial, lucru confirmat și de prezența însușirilor antimicrobiene. Prin urmare viteza de oxidare dă posibilitatea de a se cunoaște mai profund calitatea propolisului decât indicele de iod și poate servi drept indicator al puritatei acestui produs.

Nici ceară și nici partea de propolis insolubilă în amestecul de alcool-eter nu au însușirile antioxidantă proprii propolisului. Spre deosebire de propolis, ele practic nu au însușiri antibacteriene. Întrucât în partea insolubilă a propolisului, inclusiv ceară de propolis, cantitatea de substanțe active este neînsemnată, numai la suspensii foarte mari se poate observa în cazul ei o reacție de decolorare a soluției de permanganat de potasiu (tabelul 3).

*Tabelul 3*

**Corpurile străine din propolis și reacția oxidării  
(La suspensia de 200 mg)**

Denumirea părții de propolis	Diluția	Conținutul de substanță uscată (mg/ml) (teoretic)	Timpul de disparație a culorii roz a soluției (sec.)
Ceară de albine	1 : 50	0,18	Nu se decolorează
Ceară de albine	1 : 5	2,0	9,2 ± 0,26
Partea insolubilă	1 : 50	0,18	Nu se decolorează
Partea insolubilă	1 : 5	2,0	6,1 ± 0,13

Soluția de permanganat se decolorează într-adevăr în prezența suspensiei de ceară de propolis sau substanțe insolubile cu impurități mecanice dacă în loc de 0,18 mg la 1 ml se iau 2 g la 1 ml soluție; 0,18 mg/1 ml constituie o normă pentru propolis cu compoziție standard.

Deci practic ceară de albine și părțile insolubile ale propolisului nu decolorează soluția de permanganat de potasiu în condițiile date și deci nu au însușiri antioxidantă, ci dimpotrivă reduc aceste însușiri.

La propolisul cu un conținut mai mare de impurități mecanice (de exemplu cel strins de pe pinzele de sub capac), viteza de oxidare este mică — soluția se decolorează în 17,5 sec., în timp ce propolisul relativ curat, strins de pe rame, de pe pereții stupului este mai activ soluția de permanganat de potasiu se decolorează în 6,5 sec. iar de la urmăriș în 4,5 sec.

Prin urmare în propolisul impur conținutul de substanțe active scade, ceea ce se constată prin reacția de decolorare a permanganatului adăugat în soluția cu substanță cercetată. Aceste date se referă la propolisul adunat la stupina Institutului de cercetări apicole din regiunea Riazan în anul 1968 de la albine din rasa din Rusia centrală și analizat în același an. Analiza s-a făcut cu 0,18 mg substanță uscată într-un ml, suspensie de propolis 200 mg, 1 : 50. La aceste date se referă cifrele tabelelor 4—6.

Viteza de oxidare depinde de cantitatea de ceară din propolis (tabelul 4). Odată cu creșterea cantității de ceară în propolis, crește și viteza de oxidare.

*Tabelul 4*  
**Viteza de oxidare și conținutul de ceară în propolis**

Localitatea unde s-a recoltat propolisul	Indicele de oxidare (sec.)	Conținutul de ceară în propolis (%)
Reg. Novosibirsk, raionul Cerepanovski, Sfatul Popular Karasevski, mai-iunie, 1968	31,6	20,5±0,5
Reg. Moscova, raionul Luhovițki, august-septembrie, 1968	28,1	18,5±0,5
Reg. Vladimir, raionul Iurev-Polski, sovhozul „Riabininski“, august-septembrie, 1968	7,77	14,5±0,5
Reg. Riazan, raionul Rîbnoie, august-septembrie, 1968	5, 20	12,5±0,5

Intrucît ceară și corpurile străine mecanice reduc calitatea propolisului, iar viteza de oxidare se schimbă în funcție de conținutul de ceară și impurități mecanice, după viteza de oxidare se poate deduce calitatea produsului.

S-au verificat însușirile antioxidantă ale unui număr de 50 probe individuale, obținute din 24 regiuni ale RSFSR. Cel mai activ este propolisul proaspăt recoltat cu termen de păstrare pînă la 1 an : viteza de decolorare a soluției de permanganat de potasiu în acest caz este de  $9,38 \pm 0,72$  sec. față de media generală de  $11,1 \pm 0,056$  sec.

*Tabelul 5*  
**Indicele de oxidare a propolisului din diferite zone**

Zonă	Indicele de oxidare (sec.)	
II Silvică și de păsune (trifoi-zmeură)	12,5 ±1,5	( 5,0—20,0 )
III Silvică și de câmp (hrișcă și tei-hrișcă)	14,88±1,78	( 6,0—25,0 )
IV—V De stepă silvestrepă (floarea-soarelui, coriandru)	14,9 ±2,9	( 14,0—21,0 )
IX Silvestrepă (Siberia de Vest)	16,6±0,8	( 4,0—24,0 )

Capacitatea de oxidare este caracteristică tuturor probelor individuale de propolis obținute din diferite regiuni ale RSFSR. Cu toate că pentru acest indice nu există o valoare unică, există anumite limite în medie de  $14,9 \pm 1,02$  sec. Limitele de variații pe zone sunt în medie —  $12,5 \pm 1,5$  —  $16,6 \pm 0,8$ ; semnificație — 95,5%; limitele de variație pe probe — 4,0—25,0.

Nu s-a evidențiat o diferență pronunțată între viteza de oxidare a propolisului recoltat din diferite zone climatice, cu excepția propolisului din zona a IX-a — din Vestul Siberiei. Propolisul din această zonă se caracterizează prin însușiri antioxidantă relativ reduse, care totuși nu depășesc limitele normei. Extractul său apos are un indice de iod scăzut în comparație cu propolisul din partea europeană a RSFSR adică cu cleiul de albine din zonele II—V.

S-a studiat propolisul adunat de albinele din două rase, aflate în aceleași condiții (regiunea Riazan or. Ribnoie, stupina Institutului de cercetări apicole 1968). Ca viteză de oxidare, probele de propolis se deosebesc neînsemnat: pentru rasa din Rusia centrală — 7,5 sec., pentru rasa cenușie caucaziană de munte — 4,5 — 5,5 sec.

*Tabelul 6*

**Oxidarea propolisului de la două rase de albine**

Locul și perioada de recoltare	Timpul în cursul căruia dispare culoarea roz (sec.)	
	Albine din Rusia Centrală	Cenușie caucaziană de munte
De pe rame, mai-iunie		$4,5 \pm 0,55$
De pe rame, iulie-august		$5,5 \pm 0,50$
De pe rame, mai-iunie	$7,5 \pm 0,55$	
De pe rame, iulie-august	$7,5 \pm 0,55$	
De pe pînză, iulie-august		$5,5 \pm 0,5$
De pe pînză, iulie-august	$18,5 \pm 0,55$	
De pe pînză, septembrie	$11,5 \pm 0,50$	

Durata de păstrare a propolisului în anumite condiții nu a influențat substanțial însușirile acestuia. Astfel, la temperatură camerei, în decurs de trei ani viteza de oxidare a propolisului practic nu s-a schimbat, adică s-a menținut la nivel, sau a crescut cu 1—2 sec.

Viteză de oxidare a propolisului depinde de condițiile de păstrare: la temperatură camerei aceasta este mai mare decât în timpul păstrării în frigider, adică la  $0-4^{\circ}$ . Diferențele observate se exprimă în 2—6 sec., iar pentru celelalte probe — 10—11 sec. Rezultate similare s-au obținut la studierea propolisului luat din diferite zone climatice din RSFSR.

Astfel s-a elaborat o metodă de determinare a vitezei de oxidare a propolisului și a fractiilor sale apoasă, alcoolică, eterică și acetonică, ca indice al calității propolisului.

Viteza reacției de oxidare a propolisului depinde de conținutul de substanță uscată a produsului cercetat în soluție. Cele mai active sunt extractele eteric, alcoolic, acetonic și în special extractul apos.

Însușirile antioxidante, proprii propolisului, nu le au nici ceară de albine și nici partea de propolis cu impurități mecanice insolubilă în amestecul de alcool-eter și în acetonă.

Viteza de oxidare variază în funcție de cantitatea de ceară și substanțe insolubile din propolis și într-o anumită măsură este legată de originea geografică a produsului.

## UNELE DATE CHIMICE ȘI FIZICO-CHIMICE ALE PROPOLISULUI RECOLTAT ÎN ROMÂNIA

Vera BOERIU, Adelina DEREVICI  
ROMÂNIA

Însușirile antioxidante nu se modifică substanțial prin păstrarea propolisului timp de 3 ani.

Viteza de oxidare permite să se constate și să se controleze calitatea propolisului ca materie primă și să se stabilească autenticitatea acestuia.

Propolisul, produs natural elaborat de albine, prezintă o compoziție chimică complexă, care pînă în prezent nu a fost complet elucidată.

Dat fiind că acest produs provine din plante foarte diferite, compoziția sa chimică prezintă variații mari. Acest fapt a determinat pe unii cercetători să efectueze analiza chimică a propolisului recoltat în diferite regiuni.

Datorită importanței pe care o prezintă acest produs prin activitățile sale biologice, în special activitatea antimicrobiană și utilizarea lui în unele scopuri terapeutice în medicina umană și veterinară, studiul compoziției chimice și identitatea compușilor responsabili de activitatea biologică prezintă un interes deosebit.

La ora actuală există numeroase lucrări interesante referitoare la cercetarea compoziției chimice a propolisului (vezi bibliografie).

În lucrarea de față, utilizând metoda cromatografiei, electroforezei, absorbției în UV și unele reacții chimice, ne-am propus să cercetăm compoziția chimică a unui propolis recoltat de noi, în ceea ce privește conținutul în compuși de natură proteică, derivații de acizi nucleici și conținutul în compuși solubili în solvenți organici.

### Material și metodă

În prima serie de cercetări am căutat să analizăm fracția ce se extrage prin tratare cu apă la cald, prezența flavonoizilor, absorbția în UV a extractului apos și analiza reziduului care rămîne după tratarea propolisului cu apă.

În acest scop, 15 g propolis (schema 1) se tratează cu 80 ml apă bidistilată într-o capsulă de porțelan și se încălzește treptat, lăsindu-se să fierbă 3 minute. Urmează răcirea conținutului în frigider. Extragerea la cald și răcirea se efectuează de 3 ori. După răcire, apa se filtrează. Pe filtru se obține componenta A, insolubilă în apă rece, care se pune în exciator și se cintărește ulterior pentru a calcula conținutul %.

Probe din fracția A au fost dizolvate în amestecul cloroform-metanol 80 : 20 și supuse analizei prin cromatografie circulară pe hîrtie și cromatografie în strat subțire.

Filtratul obținut după filtrarea apei răcite se păstrează și reprezintă fracția B. Această fracție conține compuși compuși extrași cu apă la cald și care rămân solubili în apă după răcirea ei.

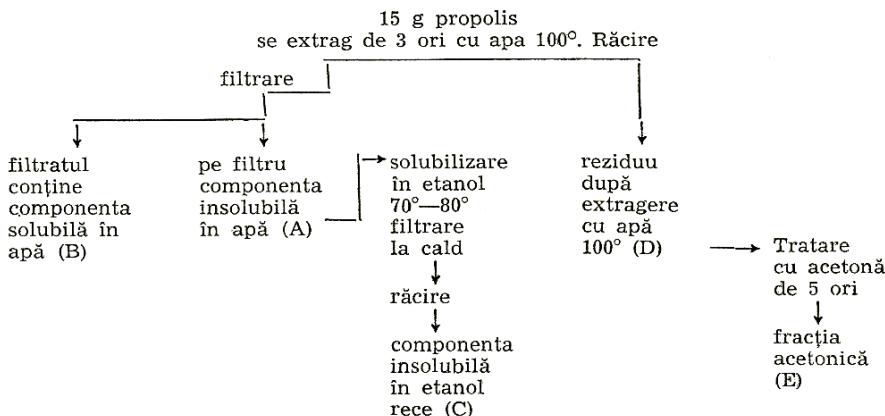
În această fracție (B) s-au efectuat următoarele analize: reacțiile pentru prezența flavonoizilor, utilizând NaOH 2N sau H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. și absorbție în UV, probele fiind citite între 370 nm și 230 nm.

Reziduul rămas după tratarea propolisului cu apă la cald se pune la exciator, se măruntește de fiecare dată pe măsură ce se usucă și se cintărește pînă la obținerea greutății aproximativ constantă, în vederea calculării conținutului %.

Această fracție, notată D, reprezintă reziduul insolubil care rămîne în urma tratării propolisului cu apă la cald de trei ori.

*Schēma 1*

**Diagrama tehnicii utilizate pentru separarea diferitelor fracții din propolis**



5 grame de reziduu D se extrag în 5 reprezente cu cîte 150 ml acetonă, la temperatura camerei și la întuneric. Extractele acetonice se reunesc și ele reprezintă fracția acetonică E, care a fost supusă analizei prin cromatografie circulară pe hîrtie și cromatografie în strat subțire.

Fracția A insolubilă în apă, se dizolvă în 80 ml etanol și se încălzește pînă la 70—80°. Se filtrează la 70°, iar filtratul obținut se răcește la frigider. Componența insolubilă în etanol rece se separă prin filtrare

la rece și apoi se pune la exicator unde se ține pînă la obținerea greutății constante, calculîndu-se conținutul ei la %. Această fracție, notată C, conține compuși solubili în etanol la 70—80° și insolubili în etanol rece.

Probe din fracția C au fost analizate prin cromatografie circulară pe hîrtie și cromatografie în strat subțire.

În ceea ce privește metodele utilizate, cromatografia circulară pe hîrtie a fost efectuată după indicațiile lui HORACEK și CERNIKOVA (5) utilizîndu-se pentru cele 3 migrări: amestecul cloroform-metanol 80 : 20 (I migrare), acetona (a II-a migrare) și metanol (a III-a migrare).

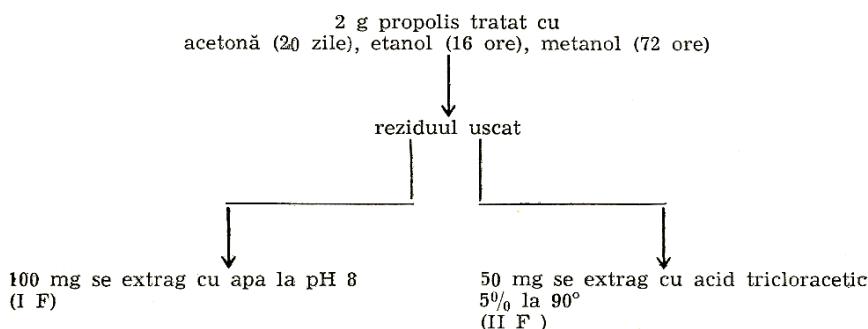
Rondelele din hîrtie Whatman nr. 1, pe care sunt înscrise 3 cercuri pentru cele 3 migrări, au fost spălate de 2 ori cu amestecul cloroform-metanol 80 : 20. Developarea a fost făcută cu acid osmic.

Cromatografia în strat subțire a fost făcută pe plăci 20 cm × 20 cm, acoperite cu silicagel H și activate 1 oră la 110°. Sistemul pentru migrare folosit a fost amestecul ciclohexan-acetat de etil-cloroform 40 : 50 : 1. Developarea a fost făcută cu acid molibdenic 10% în metanol și încălzire 5—10 minute la 120°.

În seria a doua de experiențe, ne-a interesat să cercetăm prezența în propolis a compușilor de natură proteică și derivați de acizi nucleici, respectiv ribo și deoxiribonucleic.

*Schema 2*

**Obținerea din propolis a două fracții : fracția cloroformică  
și fracția metanolică**



2 g de propolis se tratează de 5 ori cu cîte 5 ml acetonă timp de 20 de zile, la temperatura camerei și la întuneric. Extractele acetonice se îndepărtează. Urmează tratarea reziduului de propolis cu etanol 16 ore și apoi cu metanol 72 ore. Propolisul astfel tratat se trece pe hîrtie de filtru, se spală de cîteva ori cu metanol și apoi se ține la exicator pînă ce se usucă. Această fracție de propolis din care s-au îndepărtat compușii solubili în solvenții organici menționati mai sus, se analizează pentru prezența compușilor de natură proteică și derivații de acizi nucleici.

În acest scop 100 mg din fracția F au fost extrase cu 3 ml apă băndistilată la pH 8 timp de 1 oră. În filtratul obținut (I F) s-au efectuat reacția cu orcinol a lui Mejbaum, reacția cu difenilamină a lui Dische absorbția în UV între 370 nm — 230 nm și electroforeza în gel de poliacrilamidă.

Pentru reacția Mejbaum probele au fost efectuate cu 0,6 ml filtrat și 0,2 ml reactiv Mejbaum iar pentru reacția Dische 0,6 ml filtrat și 0,6 ml reactiv Dische.

Electroforeza în gel de poliacrilamidă a fost efectuată cu 0,2 ml filtrat pe tub, tampon Tris-acid boric pH 8,2, timpul de migrare 3 ore 1/2 iar developarea cu Amidoschwarz.

Separat s-au luat 50 mg fracția F, care a fost extrasă cu 2 ml acid tricloracetic, timp de 15 minute la 90° după Schneider. După centrifugare, în supernatantul (II F) s-au efectuat reacțiile Mejbaum și Dische și absorbția în UV.

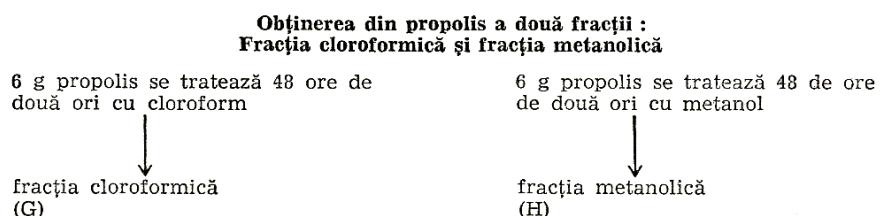
În ultima serie de cercetări ne-a interesat să analizăm prezența în propolis a compușilor solubili în solvenți organici și anume în cloroform și în metanol.

6 g propolis se tratează de două ori, timp de 48 ore cu cloroform, la temperatura camerei și la întuneric. Extractele reunite formează fracția cloroformică (C).

Pe o altă probă de propolis s-a efectuat extracția cu metanol în aceleași condiții. Acest extract reprezintă fracția metanolică (H).

Aceste două fracții au fost analizate prin cromatografie circulară pe hirtie și cromatografie în strat subțire.

**Schema 3**



### **Rezultate și discuții**

Rezultatele cercetărilor noastre pun în evidență complexitatea compoziției chimice a propolisului analizat de noi.

Utilizând ca metode de analiză cromatografia circulară pe hirtie, cromatografia în strat subțire, electroforeza în gel de poliacrilamidă, absorbția în UV precum și reacțiile chimice Mejbaum și Dische, am reușit să demonstrează prezența diferitelor compuși care diferă prin natura lor chimică sau proprietățile fizico-chimice. Astfel, tratând propolisul cu diferiți solvenți, ca cloroform și metanol, s-a putut pune în evidență prezența diferitelor grupe de compuși ce diferă prin solubilitatea lor.

S-a constatat în primul rînd că extractul cloroformic de propolis (G), analizat prin cromatografie circulară pe hîrtie, conține 3 grupe de compuși ce diferă prin solubilitatea lor și anume: 1, compuși solubili în amestecul cloroform-metanol și insolubili în acetonă sau metanol (acești compuși migrează în cercul 1); 2, compuși solubili în acetonă și insolubili în metanol (migrează în cercul 2); 3, compuși metanol solubili (migrează în cercul 3). Prin cromatografia pe plăci în strat subțire, extractul cloroformic arată prezența a 9 spoturi.

Spre deosebire de extractul cloroformic, extractul metanic evidețiază prin cromatografie circulară pe hîrtie o singură grupă de compuși care migrează în cercul 3, deci metanol solubil și care în condițiile noastre de lucru prin cromatografie în strat subțire a arătat prezența a 9 compuși. Se constată însă că cromatografia în strat subțire a celor două extracte — cloroformic și metanic — diferă.

Fracția A, după cum am menționat, se extrage cu apă la cald și apoi se separă din apă prin răcirea ei. Această fracție reprezintă 10% din conținutul total al propolisului. Analiza fracției A prin cele două metode cromatografice arată că ea conține de asemenea compuși solubili în cloroform-metanol, compuși aceton-solubili și compuși metanol solubili, deci compuși care migrează în curcurile 1, 2 și 3, iar prin cromatografie în strat subțire se constată prezența a 9 spoturi.

Analiza fracției B, fracție solubilă în apă rece, a arătat prezența flavonoizilor, reacția fiind pozitivă atât cu NaOH 2N cât și cu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrat (tabel 1).

Tabelul 1

**Analiza fracțiilor din propolis**

	Conținutul %	Reacția pt. flavonoizi	Reacția cu orcinol	Reacția cu difenilamină
1. Fracție insolubilă în apă (A)	10%			
2. Fracție solubilă în apă (B)		NaOH 2N ++ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , conc. +		
3. Fracție solubilă în etanol la 70—80° și insolubilă în etanol rece (C)	3,7%			
4. Reziduu de propolis rămas după extragere cu apă la 100° (D)	78%			
5. Fracția acetonică a reziduului D de propolis (E)				
6. Fracția extrasă cu apă pH 8, din propolis tratat cu acetonă etanol, metanol (I F)			+	-
7. Fracția extrasă cu acid triclor-acetic 5% la 90° din propolis tratat cu acetonă, etanol și metanol (II F)			++	-
8. Fracția cloroformică (G)				
9. Fracția metanolică (H)				

Fracția A este o fracție complexă. Ea conține în general ceară, precum și alte componente care se antrenează odată cu separarea cerii în urma răcirii apei.

Fracția C, solubilă în etanol cald și insolubilă în etanol rece, reprezintă 3,7% din conținutul total al propolisului. Cromatografia pe hîrtie evidențiază 2 grupe de compuși: compuși solubili în amestecul cloroform-metanol dar insolubili în acetonă sau metanol și compuși solubili în acetonă (tabel 2).

Prin cromatografierea în strat subțire, fracția C arată prezența a 3 spoturi.

Reziduul de propolis care rămîne după tratarea propolisului de 3 ori cu apă la cald și apoi uscat reprezintă 78% din propolisul total (fracția D).

Fracția D a fost supusă de repetate ori extractiei cu acetonă. Analiza extractelor acetonice reunite (fracția E) arată că prin cromatografie pe hîrtie se constată prezența unei singure grupe de compuși care migrează în cercul 3, deci compuși metanol solubili. Aceasta nu exclude posibilitatea solubilizării și în primii solvenți folosiți pentru cromatografiere pe hîrtie. Cromatografia în strat subțire a fracției E a arătat că ea conține un număr de 9 compuși, dat fiind că cromatogramele developate au arătat prezența a 9 spoturi. Ele constată că fracția E conține foarte puțini compuși, care au fost îndepărtați prin extragerea cu apă la cald și pe care îi constatăm în fracțiile A și C.

**Tabelul 2**  
**Extrase din diversi solvenți**

Absorbția în UV	Electroforeza gel poli- acrilamidă	Cromatografie circulară pe hîrtie	Cromatografie strat subțire
maximum 300 nm		Compuși solubili în cloroform-metanol, acetonă, metanol	9 proturi
nu prezintă maxim între 370—230 nm	8—9 fracții	Compuși solubili în amestec cloroform-metanol, acetonă	3 spoturi
nu prezintă maxim între 370—230 nm		Compuși metanol solubili	9 proturi
		Compuși solubili : în amestec cloroform-metanol acetonă, metanol	11 spoturi
		Compuși solubili metanol	11 spoturi

În seria a doua de analize ne-a interesat să cercetăm compoziția chimică a propolisului în ceea ce privește compușii de natură proteică sau derivații de acizi nucleici.

Pentru aceasta era necesar să se obțină din propolis o fracție din care să fie îndepărtați toți compușii care ar fi deranjat efectuarea electroforezei sau a reacțiilor cu orcinol și difenilamină. În acest scop au fost îndepărtați din propolis compușii solubili în solventi organici, iar alegera solventilor a fost făcută înăind cont de posibilitatea de extragere cît mai mare și diferită. De asemenea au fost aleși numai solventi organici miscibili cu apă. Electroforeza în gel de poliacrilamidă a extractului apos (fracția I F) din propolisul tratat anterior cu acetonă, etanol și metanol ne-a arătat o separare de 8—9 fracții care au fost colorate cu Amidoschwarz. Menționăm că A. DEREVICI, cercetând compoziția chimică în aminoacizi a aceluiasi propolis, în urma efectuării hidrolizei acide, pune în evidență prin cromatografie pe hîrtie prezența a 8 aminoacizi. În ceea ce privește conținutul pentru derivații de acizi nucleici ARN sau ADN noi am efectuat reacția cu orcinol pentru riboză și reacția cu difenilamină pentru dezoxiriboză. Din analizele făcute se constată că numai reacția pentru riboză a fost pozitivă în extractul apos sau în extractul de acid tricloracetic, în timp ce reacția pentru dezoxiriboză, în condițiile noastre de lucru a fost negativă.

Efectuind paralel curbele de absorbție în UV între 370 nm și 230 nm la aceleași fracții (I F și II F) nu s-a obținut un maxim caracteristic pentru bazele azotoase de acizi nucleici. Acest fapt ar putea fi explicat prin prezența diferenților compuși în extract care nu au permis obținerea unui maximum la 260 nm.

Menționăm că, efectuind absorbția în UV cu fracția apoasă B, a fost obținut un maxim de absorbție la 300 mμ

În concluzie, din analizele efectuate de noi, se constată în primul rînd că propolisul conține grupe de compuși solubili în solventi organici, care diferă prin solubilitatea lor și prin conținutul lor în compuși separați prin cromatografie în strat subțire. Acești compuși au prezentat reacții de colorare cu acid osmic și cu acid fosfomolibdenic.

Efectuarea electroforezei pe gel de poliacrilamidă cu un extract apos a demonstrat prezența a 8—9 fracții colorabile cu Amidoschwarz, în timp ce analiza efectuată pentru derivați de acizi nucleici nu a arătat decât prezența unei reacții pozitive pentru riboză.

De asemenea a fost pusă în evidență prezența flavonoizilor și un maxim de absorbție la 300 nm.

#### B I B L I O G R F I E

- DEREVICI, A. — Analyse des propriétés physique et chimiques de la propolis. IIe Symposium sur la propolis, Bratislava 1976
- DISCHE, Z. — in „Techniques de laboratoire“ tome Ier, Ed. Masson et Co., Paris, 1954.
- FRÖST, S., ASKER, S. — Further studies of flavonoid patterns in barley, *Hereaitas*, 1973, 75 : 201—206.

- HEINEN W., LINSKENS H. — On the occurrence of fatty acids in propolis, *Portugalia Acta Biologica* 1971, XII, 1—2, 65.
- HORACEK J., CERNIKOVA M. — Examination of Lipids in Human Serum by Disk Chromatography, *Biochem. J.*, 1959, 71, 417.
- PPALMBAHA, S., POPRAVKO, S. — Compoziția chimică și activitatea biologică a propolisului. *Propolis*, Ed. APIMONDIA, București, 1975.
- POPRAVKO S. — Compoziția chimică a propolisului. Op. cit.
- SCHNEIDER W. — in : Methods in Enzymology, Academic Press, New York, 1957.
- UŠKALOVA, V., TOPALOVA O. — Cercetarea cerurilor din propolis. *Propolis*, Ed. APIMONDIA, București, 1975.
- VILLANUEVA V., BOGDANOVSKY D., BARBIER M., GONNET M., M. LAVIE. — Sur l'isolement et l'identification de la 3, 4, 7-trihydroxyflavone (galangine) à partir de la propolis. *Ann. Inst. Pasteur*, 1963, 106, 4124, 292.

## STUDIUL STRUCTURII CHIMICE A PROPOLISULUI, IZOLAREA ȘI IDENTIFICAREA ACIDULUI 4-OXI-3-METOXICINAMIC DIN PROPOLIS

J. ČIŽMARIK, J. MATEL  
CEHOSLOVACIA

Pentru asigurarea acurateții studiului biochimic, farmacologic și clinic al propolisului trebuie cunoscută cu precizie compoziția chimică a acestuia. Până acum în propolis s-au identificat în total 19 substanțe cu o structură chimică diferită.

În propolis sunt descriși acidul cinamic și alcoolul cinamic, chrizina (KÜSTENMACHER, JAUBERT) și vanilina (DIETRICH). Cercetătorul sovietiv POPRAVKO a găsit în propolis izovanilina, acacetina, kaempferida, ramnocitrina, quercentina, pinostrobina, 5-oxi-7,4-dimetoxiflavonă; 5,7-dioxi-3,4-dimetoxiflavonă, 3,5-dioxi-7,4-dimetoxiflavonă și 5-oxi-7,4-dimetoxiflavonă. Am izolat din propolis și am identificat acidul cafeinic, iar un colectiv de cercetători francezi sub conducerea lui V. R. VILLANUEVA au identificat în propolis galangina, chrizina, tec-tochrizina, izalpinina și pinocembrina.

Experiențele preliminare și rezultatele cromatografiei pe hârtie și în strat subțire arată că propolisul mai conține o serie întreagă de compuși, neidentificate până acum. De aceea, în cercetările noastre am căutat să-i identificăm.

Analiza s-a făcut după următoarea schemă. *Extractia* : 100 g propolis s-au extras în 2 l benzol anhidru, fără încălzire, timp de două zile. După filtrare soluția de benzol a fost înălțurată prin distilare în vacuum și sedimentul a fost extras cu un filtru de alcool etilic anhidru. Extractia s-a făcut timp de 24 ore, fără încălzire. Soluția roșie-cafenie obținută a fost distilită pentru înălțurarea totală a lichidului și s-a extras în 500 ml apă rece, timp de 3 zile. După extragere, sedimentul a fost recristalizat în apă fierbinte. Cristalele formate s-au separat și dizolvat în 10 ml alcool anhidru. Soluția obținută a fost aplicată pe

un strat subțire de silicagel și s-a cromatografiat în sistemul benzol-dioxan-acid acetic în raport 90 : 5 : 4. Cu ajutorul razelor ultraviolete s-a stabilit că cromatograma conține 5 compuși. Acidul cafeinic izolat și descris de noi avea benzi corespunzătoare unei  $R = 0,24$ .

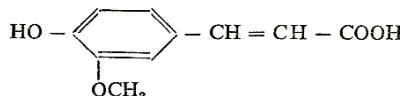
În zona cu  $R = 0,50$  se găsea o substanță care, în ultraviolet, avea fluorescență albastră; această zonă a fost extrasă cu alcool etilic, antrenată cu vaporii și cristalizată.

Din cele 15 zone obținute astfel, extractul alcoolic a fost înălțurat în întregime prin uscare. Cristalele mici obținute după recristalizare în apă fierbinte au avut punctul de topire  $168^{\circ}$ . Întrucât substanța cu acest punct de topire nu a fost încă descoperită în propolis, ne-am concentrat asupra identificării sale.

*Identificarea:* Soluția alcoolică a substanței izolate a prezentat reacții chimice caracteristice pentru grupele carboxilice și hidroxilice, cu legătură dublă și reacția care demonstrează prezența grupării metoxi.

La cercetarea soluției alcoolice în ultraviolet am determinat maximum de absorbție în lungimea de undă de 322 nm.

După rezultatele studierii acestei substanțe cu ajutorul cromatografie pe hîrtie și în strat subțire, al luminii infraroșii și al spectrului de rezonanță magnetică nucleară, am determinat că această substanță este acidul 4-oxi-metoxicinamic, care în literatura chimică se numește ferulic și are următoarea formulă structurală;



Justificația presupunerii a fost demonstrată prin cercetarea valorii Rf a acidului izolat și a soluției de acid martor. Ambele substanțe au avut aceleași valori Rf, același caracter de absorbție a razelor ultraviolete și infraroșii.

*Acțiunea farmacologică.* Acidul ferulic se caracterizează prin acțiune antibacteriană (organisme grampozitive și gramnegative); el contribuie la acțiunea bactericidă și bacteriostatică a propolisului, fenomen deja descris de către autori.

În afară de aceasta, se manifestă într-un grad însemnat acțiunea aglutinantă — exploatață în tratamentul rânilor ce se vindecă greu, cu ajutorul unei alifii preparate din soluție alcoolică de propolis și acțiunea colagenă descrisă în 1938.

Acidul ferulic se găsește în special în sucul lăptos al rădăcinii de *Ferula foetida*, în rășina de *Opopanax chironium*, *Catalpa ovata* și în *Ajugaiva*. În afară de aceasta există și în *Equisetum himolo*, *Dahlia variabilis* și *Berberis amurensis*.

Acidul ferulic ajunge în propolis în special din rășina de *Pinus laricio* în care acest acid a fost găsit încă în 1876, din *Pinus cembra* și din rășina de molid.

De pe aceste plante albinele culeg foarte intens — în special toamna — rășina, ca parte componentă principală a propolisului. Albina

poate sintetiza acest acid și ca produs secundar al disocierii glicozidelor vegetale în care acidul ferulic este prezent ca aglicon.

Avinț în vedere că în polen acest acid nesaturat nu a fost încă găsit, descoperirea lui în propolis servește ca argument principal în combaterea teoriei lui KÜSTENMACHER și în favoarea părerii că albinele culeg propolisul din secrețiile răšinoase ale mugurilor și scoarței diferitelor plante.

## CONTRIBUȚII LA CUNOAȘTEREA COMPOZIȚIEI PROPOLISULUI

K. JANEŠ  
V. BUMBA  
CEHOSLOVACIA

În cadrul laboratorului de cosmetică al Institutului de cercetări pentru industria grăsimilor din Praga ne-am ocupat, printre altele, și de problemele compoziției și calității propolisului. Deoarece considerăm că am ajuns la unele concluzii interesante, în cele ce urmează ne vom referi pe scurt la evoluția experiențelor realizate.

În primul rînd am examinat însușirile extractelor obținute cu ajutorul unor dizolvanți diferenți, dintr-un număr de 11 mostre de propolis; cercetarea s-a efectuat în domeniul ultraviolet al spectrului, cu scopul de a aprecia posibilitățile de utilizare a extractelor de propolis ca filtre ale radiației solare. Concluziile acestor experimentări pot fi rezumate după cum urmează :

a) cele mai bune rezultate au fost obținute cu extracte pe bază de alcool etilic (raport 1 : 10, extracție 24 ore) ;

b) toate extractele în intervalul de la 200 la 370 mμ au prezentat o maximă caracteristică la lungimile de undă de 235, 285, și 314 mμ — chiar dacă au apărut unele deosebiri, în funcție de cantitate ;

c) acțiunea extractelor de propolis nu depinde de culoarea lor.

Această calitate este determinată, în mod evident, mai ales de derivatele acidului cinamic, precum și de unii compuși ai acidului galic.

În fază următoare am încercat să izolăm aceste principii active. În cursul acestui proces am reușit să obținem un amestec cristalin caracteristic de care ne-am ocupat amănunțit.

### Partea experimentală

S-a înlăturat ceară din 150 g propolis prin încălzire în 350 ml de apă. Acest proces a fost repetat de două ori, pînă la eliminarea deplină a cerii de albine. Restul a fost supus unui proces de distilare în vaporii de apă, obținîndu-se astfel 3 litri de distilat. După filtrarea distilatului a urmat un proces de extracție cu eter etilic, repetat de cîteva ori. Stratul de eter a fost înlăturat de fiecare dată. Eterul a fost înlăturat prin distilare din cantitatea totală de extract, obținîndu-se un volum

total de cca. 50 ml. Într-un interval de 20—24 ore, și uneori chiar mai devreme, din această soluție s-au desprins cristale caracteristice, acoperite cu o peliculă uleioasă. Cristalele respective au fost separate, treând printr-un amestec de eter etilic-eter de petrol în proporție de 1 : 1 și, apoi, recristalizate. Punctul de topire al acestei substanțe a fost la 115—118°C. În urma examinării la microscop, în afara cristalelor, s-a constatat și prezența unor picături cu aspect uleios. Substanța cristalină obținută prin patru distilări în vaporii de apă a fost amestecată și supusă sublimării fracționate. Au fost obținute 3 fracții. Prima dintre ele conținea, în cea mai mare parte, componenta uleioasă, cea de-a doua era cristalină, iar cea de-a treia era, iarăși, plină de impurități.

Cea de a doua fracție a fost recristalizată din nou în eter, substanța obținută astfel având punctul de topire la 122°C. Substanța a fost analizată cu ajutorul spectroscopiei în infraroșu și a rezonanței magnetice nucleare, fiind identificată ca acid benzoic.

Identificarea a fost verificată în continuare, cu ajutorul cromatografiei în strat subțire, în trei sisteme diferite :

a) în sistemul acetonă-eter de petrol 1 : 3 pe silufol, după metoda lui Lyman (1). Valoarea  $R_f$  a corespuns valorii standard a acidului benzoic, 0,35 ;

b) în sistemul etanol-apă-amoniac (25%) 25 : 3 : 4 pe silufol, după metoda Braun-Geenen (2). Valoarea  $R_f$  a corespuns valorii standard a acidului benzoic ;

c) în sistemul eter etilic-eter de petrol 3 : 7 ; valoarea  $R_f$  a corespuns valorii standard a acidului benzoic.

Alte probe de identificare au fost efectuate cu ajutorul cromatografiei pe gel de dextrină, prezența acidului benzoic fiind demonstrată prin compararea volumelor obținute cu valoarea standard. În cursul acestui proces, s-a constatat că fracția nr. 2 conține, în afara acidului benzoic, și o cantitate mică dintr-o substanță necunoscută. Prezența acestei substanțe a fost constatătă și la chromatografia în strat subțire, în toate sistemele amintite mai sus. Este vorba de o substanță puternic aromată, care prezintă, la 254 m $\mu$ , o fluorescență intensă, de culoare albăstru deschis. Din observațiile de pînă acum, se poate desprinde concluzia că avem de a face cu o substanță aromatică, mononucleică și cu greutate moleculară mai mare decît cea a acidului benzoic. Prezența sa a fost stabilită, în diferite cantități, în toate cele trei fracții obținute prin sublimarea fracționată. În prima și în cea de a treia fracțiune, aceste două substanțe, respectiv acidul benzoic și substanța fluorescentă, sănătoase de un mare număr de alte elemente. Ne ocupăm în continuare de identificarea substanței care apare pe lîngă acidul benzoic, pentru a stabili dacă este vorba de o substanță deja cunoscută în compoziția propolisului, sau care abia urmează să fie determinată.

Prin lucrările efectuate de noi a fost dovedită prezența în propolis a acidului benzoic. Din 150 g propolis s-au obținut 1—2 g de amestec cristalin, care conține aproape 50% acid benzoic. Cantitatea de amestec cristalin obținută a variat în funcție de raportul dintre ceară și rășini în diferitele mostre de propolis examineate.

Prezența acidului benzoic în propolis poate fi explicată prin faptul că acesta se găsește în natură, într-un mare număr de plante (afine, muguri de plop etc.), de pe care este colectat de albine, împreună cu alte substanțe.

Înăind seama de diversele efecte ale acțiunii acidului benzoic asupra microorganismelor, putem trage concluzia că acesta contribuie, împreună cu alte substanțe, la efectele bacteriostatice și bactericide ale propolisului.

#### B I B L I O G R A F I E

LYMAN R. L. și col. *J. Org. Chem.* 23, 756/1958.

BRAUN D., H. GEENEN. *J. Chromatography* 9, 363/1962.

#### RAPORTURI EXISTENTE ÎNTRE PROPOLIS, MUGURII DE PLOP (*POPULUS SP.*) ȘI CASTOREUM

P. LAVIE  
FRANȚA

Am arătat în publicații anterioare legătura strânsă care exsită între propolisul prezent în stup și substanțele ce acoperă mugurii de plop (*Populus nigra* L.) și care constituie originea lui principală (LAVIE 1960, 1973). Importanța salicineelor pentru albină se regăsește în mod curios și la castor (*Castor fiber*). Cîteva observații mai vechi și recente experiențe ne-au permis să confirmăm un mare număr din aceste relatărî.

Raporturile strinse dintre mugurii de plop și propolis sunt demonstrează astăzi de numeroși autori; am susținut acest punct de vedere la Simpozionul științific care a precedat Congresul internațional de apicultură de la München în 1969. Mai recent, la Simpozionul de la Bratislava, ČIŽMÁRIK și colab. (1972) au adoptat ipotezele noastre. Propolisul are ca origine principală substanțele recoltate de pe mugurii de plop sau de salicinee în mod mai general. Materiei răšinoase brute albina îi adaugă secreții salivare, ceară, și mai apar grăuncioare de polen și impurități diverse cum sunt peri chitinoși de pe corpul albinei. Cînd poppii sunt rari sau absenți în jurul stupinelor, albinele recoltează parțial sau în totalitate substanțe asemănătoare pe mugurii altor arbori, dintre care pe unele le-am studiat (LAVIE 1960). Dar știm pe de altă parte (GONNET 1968 și 1969) că în absența răšinii de pe mugurii de plop albina nu folosește materiale asemănătoare decît în caz de extremă nevoie și că de altfel aceste materiale nu au aceeași activitate biologică ca propolisul. Aceste constatări explică marea variabilitate de culoare și miros care există între diferențele eșantioane de propolis de proveniențe diverse. Alți autori au arătat de altfel că există propolis cu origini și proprietăți biologice diferențite (HAMBLETON 1950, VERGÉ 1951, DEREVICI și colab. 1964, MAKASHVILI 1972, POPRAVKO 1972, etc.).

Încă din 1873 PICCARD a evidențiat chrizina și tectochrizina în substanță cu care sînt îmbibați mugurii de plop dorminzi. În 1968 EGGER și TISSUT izolează din mugurii de plop galangina, pinocembrina și izalpinina și confirmă lucrarea lui PICCARD. Ei emit ipoteza că aceste substanțe ar proteja într-o anumită măsură planta contra microorganismelor în timpul perioadei de somn. De altfel JAUBERT în 1927 descoperă chrizina și tectochrizina în propolis. Noi, pornind de la propolis am izolat și identificat substanțele antibiotice : galangina (3, 5, 7, trihidroxiflavonă), pinocembrina (5, 7 dihidroxiflavonă) și izalpinina (VILLANUEVA și colab. 1964, 1970), aceștia din urmă confirmind de asemenea lucrarea lui JAUBERT. Pe scurt, există deci 5 substanțe prezente în același timp în mugurii de plop și în propolis : chrizina, tectochrizina, galangina, izalpinina și pinocembrina.

În afara de aceasta, lucrînd cu extracte de propolis și extracte de muguri de plop, am constatat o acțiune antibiotică similară față de 10 sușe bacteriene, celelalte organe ale arborelui avînd acțiune antibiotică redusă sau absență (LAVIE 1960). De asemenea acțiunea antifungică a propolisului (LAVIE 1960) se regăsește în substanțele care acoperă mugurii de plop (EGGER și TISSUT 1968).

Cele două substanțe și extractele lor au un miros identic și amîndouă sînt atractive pentru albine.

VUILLAUME (1958) a arătat la rîndul său că extractele de propolis și cele din muguri de plop inhibau construcția botilor în coloniile de albine.

În fine, extracte din cele două substanțe au fost utilizate în preparate de uz medicinal uman sau veterinar, în special pentru acțiunea lor antialgică. Populeum, pe bază de extract de muguri de plop a fost folosit în Franța contra durerilor. Preparate pe bază de propolis sînt folosite în U.R.S.S. în special în antiodontalgie (MUCINIK și SUHACIOVA 1964) și în stomatologie (MARCENKO 1960), de mai mulți ani, cu succes.

Castorul (*Castor fiber*) este un mamifer care se hrănește în mare parte cu scoarță, rămurele și muguri de plop sau de salcie. Acest regim îi este atît de necesar încît animalele captive private de această hrână contractează rapid boli infecțioase (RICHARD). Castorul este foarte cunoscut de secole și în special pentru producția de castoreum, substanță complexă acumulată în glande speciale și care a fost utilizată de om în diverse scopuri. Această substanță era pînă nu de mult vîndută foarte scump și era foarte căutată, în special pentru diverse utilizări medicinale din care HINZE (1950) a alcătuit o listă foarte lungă. Dar castoreum servește înainte de toate animalului pentru a-și marca teritoriul și în mod secundar pentru a-și lustrui blana cînd își face toaleta. Cu ocazia primelor mele contacte cu castorii, am recunoscut imediat mirosul de propolis, practic al mugurilor de plop.

Lucrările lui LEDERER (1946, 1951) asupra castoreumului au evidențiat în această substanță patruzeci de substanțe izolate și identificate, dintre care unele sînt folosite în parfumerie. Este surprinzător să găsești atîția constituienți neobișnuiți (majoritatea aromatici) într-o glandă animală. După acest autor, aceasta s-ar datora unei duble cauză principale.

În primul rînd, regimul său alimentar : animalul se hrănește cu muguri și scoartă de arbori, țesuturile cărora conțin numeroși compuși care au fost regăsiți în glandele sale. În al doilea rînd : la alte vertebrate, absorția acestor substanțe odată cu alimentele ar antrena eliminarea lor în urină ; la castor însă, ele sunt stocate în glandele sale și acumulate în stare liberă.

Locurile unde castorul își marchează teritoriul pe malurile rîpoase atrag albinele culegătoare la fel ca și miroslul extractelor de propolis și de plop. Aceste observații au fost făcute de RICHARD și de mine acum cîțiva ani. De altfel acest comportament al albinelor este semnalat de HINZE (1950). Alte observații ne-au confirmat că în locurile pe unde este depus castoreum nu se dezvoltă vegetație. Să fie oare propolisul antigerminativ pentru plantele superioare ? Mai sunt necesare experiențe în această direcție.

Proprietățile antialgice ale castoreumului au fost utilizate în farmacia veche. Foarte curios, ca și propolisul, el a fost folosit între altele pentru calmarea durerilor de dinți (LONICERUS 1578, citat de HINZE).

RICHARD mi-a semnalat că pe cadavre de castor abandonate putrezirii timp de un an, glandele cu castoreum se conservă și protejează țesuturile învecinate, de unde deducem acțiunea lor bactericidă și antifungică. Pe de altă parte, castorii râniți se vindecă bine în general, în timp ce la şobolanii râniți cicatrizarea este slabă. Trebuie să reamintesc că, castorii se ung cu castoreum după ce își termină toaleta.

În ceea ce privește valoarea antibiotică a castoreumului, am verificat-o pe 7 sușe bacteriene — cîteva încercări *in vitro* cu un extract alcoolic. Am comparat această acțiune cu cea a extractelor alcoolice de propolis și de muguri de plop. Se poate constata că în majoritatea cazurilor există un mare paralelism de acțiune a diferitelor extracte. Pentru confirmarea rezultatelor obținute sunt necesare noi experiențe, dar se poate spune încă de pe acum că cele trei substanțe — muguri de plop, propolis și castoreum — se asemănă sub numeroase aspecte.

Consider că era interesant să atragem atenția asupra importanței salicinelor în mediul înconjurător și să remarcăm această convergență de similitudini între cele trei substanțe.

#### BIBLIOGRAFIE

- CIZMARIK J., MÁCIČKA M., MATEL J., 1972 — Analysis and critics of the origin theories of propolis, 1er Symposium international de la propolis Bratislava, Novembre 1972.
- DEREVICI A., POPESCO A., POPESCO N., 1964 — Recherches sur certaines propriétés biologiques de la propolis. *Ann Abeilles*, vol. 7, No. 3.
- EGGER K., TISSUT M., 1968 — Sur la présence de la galangine, pinocembrine et isalpinine dans les bourgeons de *Populus nigra* L. var. *italica* C. R. Acad. Sc. T. 267.
- GONNET M., 1968 — Propriétés phytoinhibitrices de quelques substances extraites de la colonie d'abeilles (*Apis mellifica* L.) : 1/Action sur la croissance de *Lactuca sativa*. *Ann. Abeilles* 11, (1) 41—47.

- GONNET M., 1968 — Propriétés phytoinhibitrices de la colonie d'abeilles *Apis mellifica* L.). 2/Action de la propolis et de quelques autres produits de la ruche sur la croissance chez *Solanum tuberosum*. *Ann. Abeille*, 11(2) 105—116
- HAMBLETON J. I., 1950 — Propolis culture. D'après U. S. patent office ; patented August, 1, serial no. 665, 410.
- HINZE G., 1950 — *Der Biber, Korperbau und Lebensweise, Verbreitung und Geschichte*. Berlin 216 pp.
- JAUBERT F., 1927 — Sur l'origine de la coloration de la cire d'abeille et la composition de la propolis *C. R. Acad. Sc.*, 184, 1134—1136.
- LAVIE P., 1960 — *Les substances antibactériennes dans la colonie d'abeilles (Apis mellifica L.)* Paris 1960, Thèse de Doctorat.
- LAVIE P., 1973 — Sur l'origine de la propolis. *Revue Française d'Apiculture*, no. 305, p. 19—21, Janvier 1973.
- LEDERER E., 1946 — Chemistry and biochemistry of the scent glands of the beaver (*Castor fiber*). *Nature*, London, 157 (3982) 231—232.
- LEDERER E., 1951 — *Odeur et parfums d'origine animale*. Industrie de la parfumerie tiré à part de 6 pages.
- MAKASHVILI Z. A., 1972 — Characteristics of Georgian propolis. 1er *Symposium international sur la propolis*. Bratislava, Novembre 1972.
- MARCHENKO A. I., 1960 — L'usage de la propolis en stomatologie. *Tezzi dokt. za Leningradskai Nauk. Konf.* Leningrad.
- MUCHNIK, I. N., SUKHACHOVA N. I., 1964 — Propolis in dental practice. *Rceto-vodstvo*, vol. 84, no. 7, p 43.
- PICCARD J., 1873 — Ber., 6 p. 884—889, 890—893, 1160—1161.
- POPRAVKO S. A., 1972 — The chemical composition of propolis, its origin and problems of propolis standardization. 1er *Symposium international sur la propolis*. Bratislava Novembre 1972.
- RICHARD P. — (Communications personnelles orales et par correspondance).
- VERGE J., 1951 — L'activité antibactérienne de la propolis, du miel et de la gelée royale. *L'apiculteur*, 95 (6), 13—20.
- VILLANUEVA V. R., BOGDANOVSKY D., BARBIER M., GONNET M., LAVIE P., 1964 — Sur l'isolement et d'identification de la 3-5-7 trihydroxyflavone (galangine) à partir de la propolis. *Ann. Inst. Pasteur*, t. 106' 292—302.
- VILLANUEVA V. R., BARBIER M., GONNET M., LAVIE P., 1970 — Les flavonoïdes de la propolis, isolement d'une nouvelle substance bactériostatique : la pinocembrine (Dihydroxy-5,7 flavanone). *Ann. Inst. Pasteur*, t. 118, 84—87.
- VUILLAUME M., 1958 — Les substances inhibitrices de la construction des cellules royales chez les abeilles. *C. R. Acad. Sc.* 246, 1298—1299.

## MUGURII DE PLOP, SURSA DE PROPOLIS

I. MARINESCU  
M. TAMAS  
ROMANIA

În apiterapia actuală întrebuițarea propolisului s-a extins la tratarea unui mare număr de maladii. Propolisul este o substanță bioactivă de foarte mare valoare, cu efect biostimulator și bioregulator. Activitatea

sa este datorată acelor elemente din compoziția sa care pot servi de catalizatori ai activității biologice a organismului ca auxine, vitamine, flavonoide, care intră în compoziția propolisului la fel ca și în aceea a mugurilor de plop și care joacă un rol de protecție foarte eficace în aceștia ca și în stup.

Trebuie să adăugăm la această listă de substanțe bioactive, microelementele prezente în propolis. Microelementele intră în hrana minerală a plantelor și microorganismelor și sunt factori indispensabili ai dezvoltării lor. În plante ele nu depășesc în general procentul de 0,02% din materia uscată, valoare sensibil egală cu aceea găsită în organismul uman de 0,017%. Din punct de vedere cantitativ se definesc ca microelemente metalele și metaloidele al căror procent nu depășește  $10^{-2}$ — $10^{-3}$  grame la 100 g substanță uscată.

Rolul microelementelor din organism este consecința capacității lor de a forma produși complecsi organo-minerali cu înaltă activitate biologică de tip oligodinamic. După activitatea lor, microelementele pot fi grupate în trei categorii :

1. Esențiale, ca : Fe, Zn, Cu, Co, Mo, Mn, I ; 2) Secundare ca : Ni, V, F, Br, Cr, Al, Sr, care pot interveni în anumite procese metabolice ;
3. Neesențiale, fără rol cunoscut : Si, Li, Ru, Ag, Cs, B, Hg.

### *1. Microelementele din propolis și mugurii de plop*

Studiul literaturii existente referitoare la microelementele conținute în propolis, precum și indicațiile existente în literatură privind caracterul zincofil al speciilor de plop, corelate cu informațiile existente care indică secreția răšinoasă a mugurilor de plop drept sursa vegetală de propolis, ne-a condus la ideea de a încerca o dozare comparativă a acestor microelemente din propolis din muguri de plop, încercând astfel să aducem o contribuție în plus în sprijinul ipotezei privind originea vegetală a propolisului.

### **Material și metodă**

Am utilizat mostre de propolis puse la dispoziție de A.C.A. Cluj-Napoca și de muguri de plop (*Gemmae populi*) recoltați de întreprinderea „Plafar” Cluj-Napoca din zona Huedin.

Din ambele produse am obținut extracte etanolice, la rece, utilizând alcool etilic de 96°. Reziduul uscat al extractului etanic de propolis (EP) a fost în medie de 32%, iar al extractului etanic de muguri de plop (EGP) de 26%. Dozarea cantitativă a microelementelor din cele două extracte s-a efectuat cu ajutorul unui spectometru cu absorbție atomică „VARIAN-AAG“.

## Rezultate și discuții

Analiza spectrală a celor două extracte etanolice a arătat prezența a 17 elemente și existența probabilă a încă 3 elemente după cum reiese din tabelul 1.

*Tabelul nr. 1*

### Determinarea microelementelor în extractul de muguri de plop (EGP) și în extractul de propolis (EP), în g% 100 g de extract

Elemente	Ba 4934	Fe 2483	Zn 8345	Cu 3247	Co	Mn 2794	Ni 3550
EP	0,007	0,020	0,030	0,040	0,001	0,010	0,001
EPG	0,001	0,015	0,090	0,008	<0,001	0,015	<0,001
Elemente	Al 3092	Sr 4607	Cr 4254	Ag 3280	V 3165	Sn 2839	Si 2516
EP	0,045	0,006	0,002	0,003	0,001	0,0035	0,030
EPG	0,030	0,002	0,001	0,002	<0,001	0,001	0,020
Elemente	Mg 2795	Ti 3349					

În afara elementelor conținute în acest tabel am pus în evidență urme ale borului, seleniului și plumbului. Datele obținute concordă în general cu cele găsite în literatură.

Cantitățile de microelemente au fost sensibil egale cu cele două extracte cu cîteva diferențe.

Diferențele cantitative mai mari care apar la unele elemente ca : bariu, cupru, aluminiu, stronțiu, siliciu, titan, credem că se datoresc îmbogățirii propolisului cu aceste elemente din polenul conținut și care într-adevăr include cantități relativ mari din aceste elemente.

În ceea ce privește conținutul redus de cobalt, molibden, vanadiu (sub  $10^{-3}$ ), găsit în extractul de muguri de plop, ne îndreptățește să emitem ipoteza că aceste elemente se găsesc în propolis tot datorită polenului conținut, care variază conform literaturii consultate între 5—11%.

Cantitatea de zinc din EGP este de 3 ori mai mare, ceea ce confirmă datele din literatură despre zincofilia plopului și, în același timp, cantitatea mai mică de zinc găsită în EP se poate explica prin utilizarea acestui element de către albină în timpul procesului de prelucrare a rășinei recoltate de pe mugurii de plop, utilizare privită sub aspectul înglobării acestui element în propriile ei enzime. De asemenea, zincul a putut fi decelat în cantități notabile în venin și în miere, ceea ce vine să explice cauza scăderii concentrației lui în propolis.

În privința numărului de elemente găsite în cele două extracte observăm similitudine calitativă, ceea ce pledează o dată mai mult pentru originea vegetală a propolisului, respectiv secreția răšinoasă a mugurilor de plop la baza procesului de fabricație a propolisului de către albine.

## Concluzii

1. Am dozat comparativ micoelementele din extractele etanolice de propolis și de muguri de plop.
2. Numărul de microelemente găsite în propolis (17 elemente) coincide cu cel găsit în mugurii de plop, ceea ce constituie o dovadă certă în sprijinul teoriei despre originea propolisului care indică drept sursă a lui exudatele răšinoase ale speciilor de plop.
3. Relativelor neconcordanțe între cantitățile diferitelor microelemente găsite în cele două extracte se pot explica ca provenind de la polenul care impurifică propolisul, cit și ca datorindu-se ușoarei diferențe ce există între cantitățile de reziduu uscat obținute din extractele etanolice fluide ale celor două produse.

### 2. Flavonoidele din propolis și mugurii de plop

Încă din 1927, JAUBERT a arătat înrudirea dintre propolis și mugurii de plop în ceea ce privește compoziția chimică. În sprijinul teoriei elaborate de RÖSCH, care afirmă că propolisul n-ar fi altceva decât secreția răšinoasă a unor muguri aparținând unor specii de foioase și răšinoase, acest cercetător și-a axat studiile sale de fitochimie asupra flavonoidelor din propolis și muguri de plop. Prin descoperirea chrizinei și tectochrizinei în ambele produse, JAUBERT aduce nu numai una dintre primele confirmări științifice a teoriei lui RÖSCH ci și primul argument privind legătura existentă între propolis și muguri de plop. Aceste flavonoide, în special chrizina, care reprezintă 0,25% din greutatea mugurilor de plop, au fost găsite în miere și ceară, ceea ce dovedește că albina prelucrează aceste secrete răšinoase pentru a le transforma în propolis; în felul acesta chrizina remanentă pe maxilare ajunge în miere și ceară colorându-le în galben. Totodată trebuie să amintim că albinele culegătoare de propolis nu au specializare strictă, ele participând activ la recoltarea nectarului.

Lucrările lui JAUBERT au fost confirmate cu un deosebit succes de LAVIE care identifică în propolis alte două noi flavonoide: galangina și pinocembrina, iar VILLANUEVA descoperă izalpinina. Ulterior ČIŽMÁRIK continuă și confirmă lucrările lui JAUBERT și mai ales ale lui LAVIE, arătând că majoritatea substanțelor flavonoide izolate și identificate în propolis, sunt în stare liberă, ca agliconi, și emite ipoteza existenței unei substanțe care în timpul prelucrării de către albine a rezinelor pentru a le transforma în propolis, descompune formele glicozidate ale flavonelor care se găsesc de obicei sub această formă în plante.

Studiile aprofundate efectuate de POPRAVKO asupra compoziției chimice a propolisului, au permis izolarea și identificarea a 11 flavonoizi, aflați ulterior și în extractele de muguri de plop și de mestecăcan.

Avind în vedere că, în compoziția propolisului, flavonoidele diferă în funcție de natura speciilor vegetale de pe care albinele recoltează secretele respective pentru a le transforma în propolis, ne-am propus un studiu comparativ al flavonoidelor din propolis și muguri de plop. În cazul unei identități sau unei compoziții chimice apropriate, mugurii de plop ar putea constitui o viitoare sursă de înlocuitor de propolis.

## **Material și metodă**

Am utilizat muguri de plop negru — *Populus nigra* L. — recoltați înainte de deschidere și uscați la temperatură camerei, precum și mostre de propolis de la apicultori din Municipiul Cluj-Napoca. Din aceste probe s-au preparat soluții extractive la rece cu alcool etilic concentrat. Punerea în evidență a flavonoidelor s-a efectuat, din aceste soluții extractive, cu reactivi de culoare citate din literatura de specialitate. Analiza calitativă a flavonoidelor am efectuat-o utilizând cromatografia în strat subțire CSS, pe plăci cu silicagel H, într-un sistem de solvenți nepolari — toluen, acetat de etil, acid formic 5 : 3 : 1. Identificarea s-a efectuat în lumină UV după revelare cu amoniac, triclorură de aluminiu sau oxiclorură de zirconiu.

Deosebit de lucrările lui POPRAVKO în care se arată că majoritatea mostrelor de propolis studiate sunt de „tip mesteacăn“ având 9 componente comune, mostrele studiate de noi au fost de propolis „tip plop“, având comune 16 componente, cu oarecare diferențe cantitative între fracțiuni.

Prin cromatografie preparativă am separat fracțiunile din cromatogramă și le-am identificat prin spectroscopie în UV. Astfel am pus în evidență, chrizina, tectochrizina, pinocembrina și galangina. Am mai identificat kaempferolul, apigenină și querctol.

Dozarea cantitativă a flavonoidelor din propolis și din mugurii de plop a dat următoarele rezultate :

*Tabelul nr. 2*

### **Dozarea cantitativă a flavonoidelor totale prin fotometrie în U.V.**

Produsul analizat	Cantit. analiz. (g)	Ext. la 322 nm	Flavonoide g%
Muguri de plop	0,005	0,965	8,05
Propolis	0,005	0,775	6,42

Determinările s-au făcut fotocolorimetric în UV, utilizând ca reactiv de culoare  $ZrOCl_2$ , rezultatele fiind exprimate în chrizină liberă.

## **Rezultate și discuții**

Prin cromatografie preparativă, combinată cu spectroscopie în lumină UV s-a pus în evidență existența atât în extractele etanolice de propolis, cât și în cele de muguri de plop a chrizinei, tectochrizinei, pinocembrinei și galanginei. Identificarea acestor flavonoide a fost însotită de punerea în evidență în ambele extracte, a încă 3 flavonoide : kaempferolul, apigenina și querctolul. Aceste 7 flavonoide identificate din totalul de 16 componente comune ambelor extracte, ne permit să afirmăm concordanța calitativă existentă privind compoziția chimică a propolisului și a secreției mugurilor de plop la mostrele studiate.

Referindu-ne la determinările cantitative putem arăta că suma flavonoizilor dozată din extractul de propolis și exprimată în chrizină liberă este mai mică decât în extractul de muguri de plop, deoarece balastul existent în propolis — ceară, polen, impurități mecanice — face să scadă titrul acestor flavonoide.

De asemenea trebuie să arătăm că aceste substanțe de tip flavonoidic le-am găsit ca agliconi, atât în propolis, cât și în mugurii de plop, însuși sistemul de solvenți folosit de noi la developarea cromatogramelor permisând numai migrarea flavonelor neglicozidate.

### Concluzii

Am izolat, identificat și dozat cantitativ flavonoidele existente în extractele etanolice de propolis și de muguri de plop.

Numărul de flavonoide identice (7) izolate și identificate din cele 16 componente comune ale cromatogramei extractelor de propolis și de muguri de plop, constituie încă o dovadă certă în sprijinul teoriei enunțată de RÖSCH privind sursa vegetală a propolisului.

Cantitatea mai mică de flavonoizi din propolis se datorează balastului conținut de către propolis.

Este posibil ca propolisul provenit din zona montană să aibă alt conținut de flavonoizi, mai ales cel recoltat din pădurile de mesteacăn. Mostrele studiate de noi arată clar că propolisul provenit din zona de deal sau din zonele în care albinele au la dispoziție plop, este un propolis de „tip plop“.

Similitudinea existentă între conținutul calitativ cât și cantitativ al extractelor de propolis și de muguri de plop ne permite să afirmăm că exudatul rezinos al mugurilor de plop poate constitui un valoros înlocuitor de propolis.

### B I B L I O G R A F I E

- MINCU, I. (1974) — *Tratat de dietetică*. Ed. Med. București, p. 117—120.  
TRIFU, M. (1978) — *Probleme acurate de biotologie*. Ed. Did. și Ped., București, p. 121.  
\*\*\* (1974) — *Les produits de la ruche — aliments, santé beauté*. Ed. APIMONDIA, p. 131.  
\*\*\* (1975) — *La propolis*. Ed. APIMONDIA, București, p. 41  
\*\*\* 1976 — *Recherches nouvelles en apithérapie*. Ed. APIMONDIA, București, p. 138, 158, 127.  
SCHELLER, S., J. SZAFLARSKI, (1977) — *Arzneimittel Forschung*, 4, p. 889—890.  
HAGENAUER, R. (1973) — *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Band 6. Birkhauser Verlag, Basel und Stuttgart, p. 241—260.  
MLADENOV, S. (1972) — *Mierea și terapia cu miere*. Ed. CERES, București.  
\*\*\* (1976) — *l'Apithérapie aujourd'hui*. Ed. APIMONDIA, București, p. 41.  
FORTESCUE, J. (1973) — CA, 79, 125053.  
KOVALEVSKI, A. L. (1971) — CA, 75, 90184.  
TELLER, H. L. D. R. CAMEROUN, (1973) — CA, 79 118188.  
VADKOWSKAJA, I. K., (1973) — CA, 78, 156619.  
NIKONOVA, N. N., (1971) — CA, 75, 139820.  
MABRY, Th. (1970) — *The systematic identification of flavonoids*. Springer Verl. Berlin.  
METZNER, J. (1975) — *Pharmazie*, 30 : 803.

## MICROELEMENTELE DIN PRODUSELE APICOLE

B. OHOTSKI  
U.R.S.S.

În literatura de specialitate există multe date privind influența microelementelor asupra vieții albinelor, dar prea puține despre influența microelementelor conținute de produsele apicole asupra organismului uman.

Produsele apicole — mierea, veninul (apitoxina), lăptișorul de matcă, propolisul, păstura și polenul au un rol esențial în profilaxia și tratarea unor boli ale omului, deoarece conțin aminoacizi, proteine, hidrocarburi, balsam, fermenti și — ceea ce e foarte important — diverse microelemente.

În prezent, conform datelor specialiștilor sovietici și din alte țări s-a stabilit că în produsele albinei melifere există următoarele microelemente: în miere — aluminiu, bor, fier, iod, potasiu, calciu, siliciu, litiu, magneziu, mangan, cupru, sodiu, nichel, staniu, osmu, plumb, sulf, titan, fosfor, clor, crom, zinc; în venin — fier, iod, potasiu, calciu, magneziu, mangan, cupru, sulf, clor, zinc; în lăptișorul de matcă — fier, aur, calciu, cobalt, siliciu, magneziu, mangan, nichel, argint, sulf, crom, zinc; în propolis — aluminiu, vanadiu, fier, calciu, siliciu, mangan, stronțiu; în păstură — bariu, vanadiu, wolfram, fier, aur, iridiu, calciu, cadmiu, cobalt siliciu, magneziu cupru, molibden, arsen, staniu, paladiu, platină, argint, fosfor, clor, crom, zinc, stronțiu.

Nici un proces biologic sau fiziologic nu are loc în organismul omului și al animalelor, fără participarea microelementelor. Ele participă la metabolism (proteic, lipidic, glucidic), la sinteza proteinei în organism, la metabolismul termic, la hematopoieză, osteogeneză, la înmulțire și la reacțiile imunobiologice. Cercetătorii au demonstrat corelația microelementelor cu vitaminele, cu fermentii și cu hormonii.

Organismul uman primește microelementele din hrană și apă. Interesant de remarcat că majoritatea microelementelor conținute în produsele apicole au fost descoperite în singele și în unele organe ale omului.

S-a stabilit că în singele omului există 24 microelemente, dintre care 22 intră și în compoziția produselor apicole. În condițiile unei insuficiențe de microelemente — vanadiu, fier, cobalt, cupru, mangan, nichel și zinc — este tulburat procesul de hematopoieză. Introducerea acestor microelemente, prin miere sau lăptișor de matcă, prin păstură sau polen, permite înlăturarea acestei anemii.

Se știe că în organismul omului microelementele sunt acumulate în mod selectiv, în diferite organe: zincul — în special în glandele sexuale, hipofiză, pancreas; iodul — în tiroidă; cuprul — în ficat și măduva oaselor; cadmiu și molibden — în rinichi; nichel — în pancreas; litiu — în plămâni; stronțiu — în oase; crom, mangan — în hipofiză.

Concentrația microelementelor în singe și în țesuturi este diferită, variind în funcție de boală, vîrstă și alte stări fiziologice printre care chiar ora din zi și anotimpul.

Activitatea biologică a multor microelemente este legată de faptul că ele acionează sinergic cu fermentii și cu vitaminele. Fierul intră în compoziția fermentilor respiratorii, zincul în compoziția fermentilor care participă la metabolismul glucidic și proteic.

Există o dependență certă între cantitatea de vitamina B<sub>1</sub> și mangan din organism, între cantitatea de vitamina B<sub>12</sub> și cobalt. Efectul tratamentului cu vitamina B<sub>1</sub> este mult mai ridicat dacă, odată cu alimentele, în organism pătrunde o cantitate suficientă de mangan. În perioada de formare a țesutului osos este necesară prezența cobaltului și a cuprului, acesta din urmă fiind legat activ de vitaminele A, B, C, E și acidul nicotinic.

Medicul B. M. HECHT a confirmat experimental că adăugarea mierii, iodului și a cobaltului intensifică activitatea fagocitară a leucocitelor, mărește rezistența organismului față de diferite boli infecțioase. De aceea, folosirea cu regularitate a produselor apicole mărește rezistența organismului nu numai datorită vitaminelor conținute, ci și a microelementelor.

În unele cazuri de afecțiuni, în țesuturile organismului este dereglat metabolismul microelementelor, ceea ce înrăutățește starea sănătății. De exemplu, unele boli cum ar fi endarteritele și boli de piele produc o scădere a cantității de cupru din țesuturi. Pentru reușita tratamentului, pe lîngă o terapie complexă, este necesar să se introducă în organism microcantități de cupru. S-a confirmat clinic și experimental că microconcentrații de zinc au proprietatea de a provoca scăderea cantității de colesterol în sânge și de a normaliza metabolismul.

O serie de boli de ficat, boala hipertonică, glaucomul, produc tulburări în metabolismul cobaltului care se elimină mai activ prin intestin și căile urinare. Prin introducerea cobaltului alături de alte mijloace hipotensive (în cazurile bolilor mai sus amintite), se constată o îmbunătățire a capacitatii funcționale a ficatului pacienților și o accelerare a scăderii presiunii arteriale și endoculare.

Exemplele prezentate demonstrează că prin conținutul de microelemente se mărește considerabil valoarea produselor apicole și că microelementele, participând la procesele metabolice, fermentative și vitaminoase, contribuie la tratarea anemiei, previn ateroscleroza, măresc forțele imunologice, accelerează procesul de tratare a unor boli și au proprietăți gerontologice.

## COMPOZIȚIA CHIMICĂ ȘI ACTIVITATEA BIOLOGICĂ A PROPOLISULUI

S. E. PALMBAHA,  
S. A. POPRAVKO  
U.R.S.S.

Interesul crescînd acordat propolisului în ultimii ani este determinat de activitatea sa biologică polivalentă. În legătură cu aceasta am inceput studierea activității biologice a principalului tip de propolis

adunat de albine în partea europeană a U.R.S.S. Acest tip de propolis este caracterizat prin prezența următorilor compuși :  $\alpha$ -acetoxibutelenol, 5-hidroxi-4'7-dimetoxiflavonă, 3,5-hidroxi-4'7-dimetoxiflavonă, 5,7-dihidroxi-3'4-dimetoxiflavonă, 5-hidroxi-4'7-dimetoxiflavonă, 5,7-dihidroxi-3'4-metoxiflavonă, 3,5,4'-trihidroxi-7-metoxiflavonă, 4',3,5,7-tetrahidroxi-3'-metoxiflavonă, 3,5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavonă și este desemnat ca propolis de tip mesteacăn.

Prin cromatografirea extractului alcoolic al acestui propolis pe coloană de silicati cu activitate de gradul II, în sistemele de eter de petrol-benzen și benzen-acetonă, am separat 20 de fracții; fiecare a fost supusă examenelor biologice pentru activitatea antimicrobiană pe următoarele culturi : *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Streptococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis* și *Mycobacterium phlei*.

Acest studiu a fost realizat prin metoda culturilor seriale folosind alcoolul sau dimetilformamida. S-a arătat că principala activitate antimicrobiană se concentreză în fracțiile 7, 8 și 9. În mod concret, față de *Staphylococcus aureus* este de 60—70 mg/ml. Studiul compoziției chimice a acestor fracții a arătat pe de altă parte că printre compușii lor principali se numără : 5-hidroxi-4'7-dimetoxiflavonă, 3,5-dihidroxi-4'7-dimetoxiflavonă, 5,7-dihidroxi-3,4-dimetoxiflavonă și compușii oleoesterici cu greutatea moleculară 284. Unii din acești compuși sunt derivați ai 3-hidroxiflavonelor și se caracterizează printr-o activitate biologică, însemnată, dar nu mai mare decât cea a fracțiilor inițiale, care indică fie prezența în acestea a unor compuși și mai activi, care se găsesc în cantitate mică, fie o acțiune sinergică a acestor compuși.

## CONTRIBUȚII LA CUNOAȘTEREA FRACTIUNILOR PROPOLISULUI. GRAD DE ANTIOXIDATIVITATE (1)

D. POPESKOVIĆ  
D. KEPČIJA  
M. DIMITRIJEVIĆ  
N. STOJANOVIĆ  
IUGOSLAVIA

Studiul aprofundat al propolisului, al activității biologice mai cu seamă, va evoluă în mod necesar în sensul separării sale de studiul constituenților săi. Anterior, noi am separat cu ajutorul cromatografiei 17 fracții (1) și am demonstrat anumite particularități ale acțiunii biologice ale fracțiunilor de propolis aplicate diverselor celule filogenetice (2).

Existența efectului antioxidant al propolisului a fost deja indicată anterior *in toto* (3). Asupra proprietăților antioxidative ale fracțiunilor particulare ale propolisului nu am găsit date corespunzătoare în literatură.

Dață fiind marea importanță biologică a efectului antioxidant în celulele ființelor vii, se acordă astăzi în domeniul științei o atenție

excepțională combinațiilor ce au astfel de proprietăți căci combinațiile antioxidative împiedică oxidarea lipidelor din țesuturi (însoțită de formarea peroxizilor toxici ai lipidelor) și, prin aceasta, ele concură la stabilizarea structurii și a funcției membranelor celulare (5). În plus, aceste combinații nu sănătățează de interes pentru diverse domenii privind protecția resturilor alimentare împotriva oxidării.

În această lucrare, am testat cîteva fracțiuni de propolis în vederea determinării gradului efectului lor oxidant.

### **Material și metodă**

Fracțiunile de propolis au fost separate cu ajutorul cromatografiei pe coloană, așa cum am indicat mai sus (1). Încercările au fost executate cu soluții de fracțiuni de propolis, pe care le-am marcat în mod convențional cu „B“, „D“, „E“, „Tp“ (propolis total), „I“, „II“ și „III“. La 20 g grăsimile de porc proaspăt topită, care a fost dozată în mici recipiente destinate dozării și evaporării, am adăugat 2 ml de soluție (ceea ce în medie corespunde la aproximativ 0,004% de substanță uscată) de fracțiuni de propolis indicate. După omogenizare, eșantioanele au fost plasate timp de 20 de ore într-o etuvă la o temperatură de 105°C. La fiecare 4 ore am luat eșantioane pentru a determina numărul de peroxid. Aceasta (pn) era determinat după metoda WHILER (4).

### **Rezultate și discuții**

Așa după cum putem vedea din datele numerice ale tabelului 1, fracțiunile de propolis utilizate prezintau diverse grade de acțiune antioxidantă.

#### **Efect antioxidantiv al fracțiunilor propolisului exprimat în valoarea numărului de peroxid al substratului**

Fracțiune de propolis	Valori ale numărului de peroxid (pn)				
	Data expunerii în etuvă la 105°C (ore)				
	4	8	12	16	20
B	1,35	2,22	2,98	7,70	15,78
D	1,19	2,45	3,04	8,87	22,23
E	1,37	1,40	1,47	2,60	3,10
Tp	1,05	1,10	0,76	1,20	1,85
I	0,34	0,57	0,76	0,88	1,26
II	0,43	0,55	0,65	0,78	0,87
III	0,57	0,68	0,94	1,55	3,42
Control	1,44	3,91	4,62	15,71	42,46

Fracțiunile B, D, E, Tp aparțin seriei experimentale *a*, în timp ce fracțiunile I, II, și III aparțin seriei *b*.

În seria experimentală *a* acțiunea antioxidantivă cea mai pronunțată aparține fractiunii Tp, apoi acest efect scade în ordinea : E, B și D. Capacitatea fractiunilor testate de a împiedica oxidarea eșantionului martor poate fi reprezentată cu ajutorul expresiei : pn/K : pn/fracțiune, și se pune în raport numeral ca cifre : 31,3 (Tp), 18,6 (E), 3,6 (B) și 2,6 (D), ținând seama de valori după trecerea a 20 de ore. Valorile fractiunilor particulare în timpul acestui proces de oxidare a grăsimii au de asemenea o semnificație analogă.

În seria experimentală *b* acțiunea antioxidantivă cea mai pronunțată se referă la fractiunea II, apoi la fractiunea I, și în final la fractiunea III. Valorile pentru expresia pn (K) : pn (Fractio) după 20 de ore sunt : 48,8 (II), apoi 33,6 (I) și 12,4 (III). Încercările executate în paralel asupra unor concentrații mai mult, apoi mai puțin ridicate decât concentrațiile anunțate arată că efectul acțiunii antioxidantive a fractiunilor de propolis supuse la încercare depinde de concentrația lor (efectul foarte mare, dacă concentrația este foarte mare, și invers).

În această fază a cercetării, nu avem o explicație obiectivă pentru un astfel de comportament al fractiunilor, căci natura chimică a fractiunilor noastre de propolis nu este încă suficient cunoscută. Conform datelor actuale ale literaturii, propolisul conține, alături de alte combinații, flavonoide active din punct de vedere biologic, despre care se știe că în diverse grade au un efect antioxidant (5) și astfel, rezultatele noastre pot fi în parte explicate cu ajutorul faptului indicat. Acest efect se explică de asemenea prin datele conform cărora cea mai mare parte a combinațiilor polifenolice de origine vegetală (ceea ce propolisul și este în marea sa parte) posedă o capacitate antioxidantivă (5).

### Concluzii

1. În această lucrare am studiat efectul antioxidant al fractiunilor propolisului (Tp, B, D, E, I, II și III) de diferite concentrații după modelul de oxidare a grăsimii de porc proaspete, determinând numărul de peroxid (pn).

2. Mărimea efectului antioxidant al fractiunilor de propolis depinde de specia și de concentrația lor ;

    b) cel mai mare efect antioxidant aparține din seria *a*) fractiunilor Tp și E, și din seria *b*) fractiunilor I și II.

2. Determinarea mai amănunțită a fractiunilor de propolis cu efect antioxidant mai pronunțat are o mai mare perspectivă pentru întrebuițarea lor eventual în practica medicinii umane și veterinară decât întrebuițarea propolisului *in toto*.

### BIBLIOGRAFIE

1. POPESKOVIC, D., DIMITRIJEVIĆ, M. — Preliminary examination of chemical and biological properties of propolis and its fraction. *Acta veterinaria* — Belgrade (à paraître).
2. POPESKOVIC, D., DIMITRIJEVIC, M. SOLDATOVIC, B., STOJANOVIC, N. — Further investigation on the effect of propolis and its fractions of same biological systems (II), *XXVI APIMONDIA international congress of apiculture*, 1977 (Adelaide, Australie).

3. PROPOLIS — *Zbornik radova, APIMONDIA, 1975.*
4. WHILER, N. — Metoda za određivanje peroksidnog broja masti, cit. după Pazarićević, J. — *Analiza životnih namirnica*, 1972.
5. BARABOJ, V. A. — *Biologischeskoe dejstvie rastitelnykh fenoljnyh soedinenij*, 1976, monografie, éd. „Naukova dumka“.

## COMPOZIȚIA CHIMICĂ A PROPOLISULUI, ORIGINEA LUI ȘI PROBLEMELE STANDARDIZĂRII

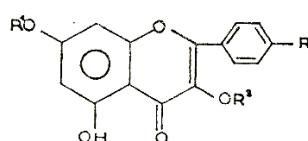
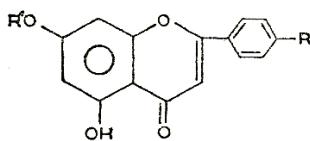
S. A. POPRAVKO  
U.R.S.S.

Baza succeselor viitoare pentru folosirea în practică a propolisului este cunoașterea compoziției lui chimice, a activității biologice a diferențierilor componente și rezolvarea problemei standardizării acestui produs.

Institutul de chimie a compușilor naturali al Academiei de științe a U.R.S.S. a întreprins în ultimii ani un studiu intens în această direcție ale cărui principale rezultate le vom prezenta în acest referat.

### **Compoziția chimică**

În cursul ultimilor ani s-a realizat un progres considerabil în cunoștințele referitoare la compoziția chimică a propolisului. Pînă în prezent cunoaștem structura chimică exactă a 18 componente ale propolisului, iar 11 din ele au fost izolate și identificate în laboratorul nostru. Mai jos sunt figurate componentele principale identificate în propolis, care formează cel puțin  $\frac{1}{3}$  din această substanță, dizolvată în alcool. După cum reiese din cele arătate, principalele componente ale propolisului sunt cele de tip flavonoid, mai ales flavone (1—4), flavonoli (5—10) și flavonone (11—14). În propolis s-au identificat și o terpenă din grupa cariofilenului —  $\alpha$ -acetoxi-betulenol (15) și o aldehidă aromatică — izovanilina (16).

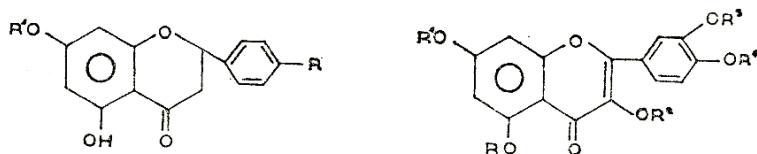


#### **Flavone**

- (1)  $R^1 = H, R = H$  (chrizină)
- (2)  $R^2 = Me, R = H$  (tectochrizină)
- (3)  $R^1 = H, R = OMe$
- (4)  $R^2 = Me, R = OME$

### Flavonoli

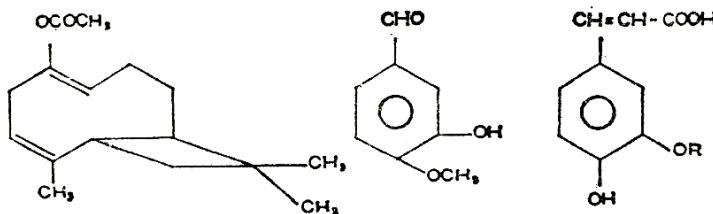
- (5) R = H, R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = Me (galangină)
- (6) R<sup>1</sup> = Me, R = R<sup>2</sup> = H (izalpinină)
- (7) R<sup>1</sup> = M, R<sup>2</sup> = H, R = OMe
- (8) R<sup>1</sup> = M, R<sup>2</sup> = Me, R = OMe
- (9) R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H, R = OMe (ramnocitrin)
- (10) R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R = OMe (kaempferid)



### Flavonone

- (11) R<sup>1</sup> = R = H (pinocembrină)
- (12) R<sup>2</sup> = Me, R = H (pinostrobin)
- (13) R<sup>1</sup> = Me, R = OMe
- (14) R = R<sup>4</sup> = H sau Me

### Derivatele quercitinei



- (15)  $\alpha$  acetoxi-betulenol
- (16) izovaniină

- (17) R = H
- (18) R = ME

Majoritatea acestor componente au fost izolate pînă acum din diverse plante, iar unele, de exemplu (18) și (13), sunt descrise pentru prima dată.

În propolis, după cum au constatat cercetătorii cehoslovaci CIZ-MARIK și MATEL, se găsesc și acizi aromatici nesaturați, cafeic și feluric (17, 18), caracterizați prin activitate biologică.

Componentele pe care le-am izolat (3—4, 7—10, 12—16) sunt caracteristice prin faptul că se găsesc în majoritatea tipurilor de propolis care se colectează în principalele zone apicole ale U.R.S.S.

## Originea propolisului

Stabilirea structurii celor mai multe din componente propolisului și punerea la punct a unor metode cromatografice eficiente pentru analiza lor au dat posibilitatea să se tipizeze compoziția chimică a mostrelor de propolis adunate în principalele regiuni apicole ale U.R.S.S.

Analiza cromatografică am făcut-o pe plăci cu un strat subțire de silicagel Silufol, în sistemul de dizolvanți acetat de etil-benzen (1 : 9) și acetat de etil-heptan normal (2 : 3). Spoturile corespunzătoare substanțelor componente s-au relevat prin stropirea plăcilor cu acid sulfuric concentrat, cu 0,5% benzaldehidă și pe urmă prin expunere la 80°C timp de 1—2 minute.

Aceste cercetări au arătat că aproape din fiecare 10 mostre de propolis adunate de pe teritoriul european al U.R.S.S., 8 sunt aproximativ identice (asemănătoare din punct de vedere al compoziției chimice). Am analizat aceste probe și pe baza analizei am demonstrat că în mostrelle de același tip se găsesc permanent componente 3—4, 7—10, 12—14 și 15.

Compoziția menționată a mostrelor de propolis adunat de pe un teritoriu geografic vast a indicat clar sursa relativ comună a materiei prime vegetale pe care o folosesc albinele la pregătirea acestei substanțe. Identificarea acestei surse pe baza principiilor taxonomiei chimice și confirmarea ei prin analiza cromatografică a părților de plante — polen, muguri diverselor esențe lemnoase, diferite secreții ale plantelor, rășini au arătat că propolisul este mai mult un amestec de substanțe pe care le elibereză mugurii de mesteacăn în perioada de repaus. Din extractele alcoolice din mugurii de mesteacăn (*Betula verrucosa*) am izolat și identificat aceleași componente aproape în aceeași concentrație ca în propolis (3—4, 7—10, 13—15). În ceea ce privește alte componente, încă neidentificate din propolisul de tipul indicat și din secrețiile de mesteacăn — apreciind după mobilitatea lor cromatografică, sunt de asemenea identice.

Pe baza acestor date tipul de propolis cel mai răspîndit care cuprinde compușii indicați, este propolisul de tip mesteacăn.

Un alt tip de propolis foarte răspîndit în partea europeană a U.R.S.S. este propolisul de tip plop, deoarece compoziția lui chimică corespunde cel mai mult compoziției secreției mugurilor de plop (*Populus nigra*). Acest tip cuprinde mai ales componente 1, 2, 5—6 și 11. Asemănarea dintre compoziția chimică a secrețiilor mugurilor de plopi și cea a propolisului recoltat în Franță a arătat-o încă de mult LAVIE și colaboratorii lui. Cercetările noastre cromatografice au confirmat această asemănare, pe multe mostre de propolis anume recoltat în zonele cu plopi din țara noastră.

Am descoperit încă o sursă vegetală de propolis. Analiza cromatografică a ghemotoacelor de pe piciorușele albinelor, recoltate de pe o plantă neidentificată pînă acum, a arătat că în aceasta sunt prezentați doi compuși cu Rf 0,40 și Rf 0,15 în sistemul de etil-heptan normal (2 : 3). Ambele se colorează în roșu închis după stropirea spoturilor

cromatografice cu acid sulfuric concentrat. Substanța cu Rf 0,40, care se găsește în majoritatea propolisurilor de tip mesteacăn, am izolat-o în stare pură atât din propolis cît și din încărcătura de pe piciorușele albinelor. Analiza fizico-chimică a indicat că substanța este un compus aromatic cu greutate moleculară 284, și cuprinde grupările fenol și metoxi și gruparea carbonil neconjugată.

Sursele indicate pentru substanțele ce alcătuiesc propolisul sănt, în zona noastră, accesibile albinelor din iunie pînă la sfîrșitul sezonului. În ceea ce privește polenul ca sursă posibilă de propolis, cercetările noastre au arătat că ideea nu pare verosimilă, pentru că spectrul polenului nu conține componente caracteristice permanente ale propolisului și deci teoria lui KÜSTENMACHER nu poate fi justă.

Cercetarea amănunțită a compoziției chimice a propolisului a confirmat deci definitiv nu numai originea lui vegetală, dar a dat și posibilitatea să se descopere numeroase specii de plante care oferă acest produs valoros și important pentru viața coloniei de albine.

### Problemele standardizării propolisului

Descoperirea componentelor permanente ale propolisului și a tipurilor lui principale dă posibilitatea să se rezolve problema dificilă a standardizării acestui produs. În ceea ce privește U.R.S.S., pe baza analizei chromatografice a numeroaselor mostre, aproximativ 90, strînse în diferitele zone ale țării — excepție făcind Extremul Orient, Asia Centrală și Caucazul — s-a constatat că în esență există 4 tipuri :

(1) tip mesteacăn	65%
(2) tip plop	15%
(3) tip mesteacăn-plop	15%
(4) diverse altele	5%

Deoarece propolisul de tip mesteacăn și cel de tip plop constituie practic majoritatea mostrelor și cuprind un mare număr de compuși chelatogeni înruditi structural cu cei fenolici, am pus la punct o metodă care ne-a permis să stabilim rapid și pe cantități de substanță foarte mici (8—10 mg) originalitatea acestui produs. Folosind cantități ceva mai mari (0,1—0,5 g) putem stabili raportul componentelor lui principale și astfel să caracterizăm pe fiecare în parte.

Baza metodelor rapide de determinare sunt reacțiile de culoare ale unei soluții alcoolice de propolis 0,1% cu numeroși reactivi de complexare (soluții apoase de clorură de fier, de acetat de cupru, de acetat de plumb), prin care se stabilește prezența și cantitatea de flavonoizi componente de tipul 11—13, ce sunt permanent prezente în propolis în chalkone colo-rate. În scopul caracterizării diferitelor componente ale propolisului se folosesc absorbția diferită a acestora pe oxid de aluminiu (gradul II de activitate) precum și capacitatea lui de a se dizolva la maximum în amestec-

eul cloroform-acetonă (2 : 1), care, în cele din urmă permite determinarea diferențială cantitativă a părții de balast și, celei biologic active din propolis.

## PROPRIETĂȚILE ANTIBIOTICE, ANTIFUNGICE ȘI FITOINHIBITOARE ALE PROPOLISULUI

P. LAVIE  
FRANTA

Propolisul este o substanță răshinoasă complexă, întrebuințată de către albine pentru a astupa fisurile stupului și a asigura etanșeitatea împotriva pătrunderii apei. Depus la intrarea stupului, el împiedică pătrunderea anumitor dușmani ai albinei prin urdiniș. Si o altă întrebuințare a sa este la fel de importantă : dacă lucrătoarele omoară un dușman în interiorul coloniei și dacă acest cadavru este prea voluminos pentru a fi expulzat, el este acoperit cu propolis, ceea ce înlătură putrefacția și orice mucegăire ulterioară.

Nu am să insist mai mult asupra bibliografiei privind propolisul, aceasta este foarte voluminoasă și adesea are un caracter științific scăzut. Am să mă refer numai la cîteva lucrări ce privesc valoarea antibiotică sau utilizarea medicală a acestei substanțe. În ce privește utilizarea medicală, CAILLAS (1954) citează observațiile lui PARVEL, care a tratat răniții în timpul războiului anglo-bur cu „propolis vasogen“ (propolis plus vaselină) și a observat acțiunea sa cicatrizantă. ROOT citează observațiile a 58 de cazuri chirurgicale în care s-a întrebuințat acest produs cu excelente rezultate în ce privește asepsia plăgilor. KIVALKINA (1948) și HAMBLETON (1950) au pus în evidență proprietățile bactericide ale propolisului.

Dar cercetările cele mai interesante asupra antibioticelor din propolis sunt cele ale cehilor FEUEREISL și KRAUS (1958). Acești autori au evidențiat activitatea diverselor extracte din această substanță asupra sușelor de bacili ai tuberculozei.

Activitatea antimicrobiană a propolisului a făcut obiectul mai multor lucrări în anii din urmă, mai ales în U.R.S.S. și în țările răsăritene. În LINDEMELSER (1967, 1989) din S.U.A. O trecere în revistă detailată asupra propolisului, publicată recent de E. L. GHISALBERTI, cuprinde 176 de referințe bibliografice, din care două treimi sunt consacrate proprietăților biologice și medicale ale acestei substanțe.

În ce ne privește, am studiat propolisul sub diferite aspecte încă de acum 20 de ani, prima notă datând din 1957. În 1960 am publicat primele fracționări ale substanțelor bacteriostatice, antifungice și fito-inhibitoare prezente în propolis. Lucrările noastre au continuat în colaborare cu echipa domnului BARBIER, Laboratorul de chimie a substan-

țelor naturale pentru izolarea substanțelor active, precum și cu colaboratorul meu, domnul GONNET, care a studiat în special acțiunea fitoinhibitoare și fitocidă a propolisului. Rezultatele acestor cercetări figurează în 17 publicații.

## I. PROPRIETĂȚILE ANTIBIOTICE ALE PROPOLISULUI

Am obținut rezultate foarte încurajatoare încă de la începutul cercetărilor mele ; extractelor apoase și alcoolice de propolis li s-au adăugat medii de cultură și au fost încercate pe 15 sușe bacteriene. Propolis cules din stupinele stațiunilor Institutului Național de Cercetări Agronomice (fie din regiunea pariziană, fie din sud-estul Franței) mi-a dat întotdeauna rezultate regulate. Acest propolis a fost extras prin două metode, cu apă și cu alcool etilic.

VERGE a remarcat o sensibilitate deosebită a bacililor piocianici la propolis ; ori, eu nu am constatat niciodată vreo acțiune bacteriostatică a extractelor de propolis asupra lui *Pseudomonas pyocyanea*, dar am constatat ca și el o acțiune pozitivă asupra lui *Bacillus subtilis*, *Bacillus alvei*, nulă sau slabă asupra lui *Salmonella*, *Escherichia coli* (3 sușe) *Proteus* 19. După părerea mea, aceste diferențe se datorează metodei de extracție și originii eșantioanelor.

KIVALKINA a găsit că o cultură microbiană în contact cu o placă de propolis este distrusă în puțin timp, 10 minute — 20 ore, în funcție de sușele studiate. Într-o altă serie de experiențe, propolisul brut este adăugat mediului de cultură în proporții variind de la 1,5% la 10%. Un anumit număr de bacterii sunt distruse, bacteriile sporogene necesită o doză foarte mare de propolis. Extrasul apos obținut prin încălzirea propolisului în apă la bain marie, este de asemenea activ. În acest caz bacilul rujeturului la porc este distrus în 30 de minute, dar alți bacili rezistă două săptămâni. După acest autor, propolisul posedă proprietăți bactericide sigure, dar foarte variabile în funcție de bacteriile studiate, cum de altfel am constatat și noi însine. Dar aceste teste au fost efectuate pe sușe bacteriene foarte diferite de ale mele și de aceea eu nu pot să compar rezultatele mele cu ale sale, în afară de cele privind bacilul piocianic (sușe neprecizate). Acest bacil este distrus, după autorul rus, după 3 ore de contact cu propolisul topit, în timp ce, aşa cum am semnalat mai sus, eu nu am putut pune în evidență această acțiune în încercările mele pe 3 sușe de *Pseudomonas pyocyanea* (sușe 3, 4 și 5 ale Institutului Pasteur). Este de remarcat că rezultatele lui VERGE au coincis cu cele ale autorului rus.

În România, DEREVICI și colab. (1964) au studiat de asemenea anumite proprietăți biologice a 3 eșantioane de propolis. Experiențele lor *in vitro* au fost realizate prin macerație alcoolică la frig și la întuneric. Extractul este adăugat unui bulion de cultură și în aceste condiții autorii au observat o acțiune de inhibare asupra a numeroase bacterii, dar nu au obținut aceleași rezultate cu ale mele. Dar și în acest caz noi nu am utilizat aceleași sușe pentru experiențe.

Am publicat de asemenea în 1960 rezultatele unei experiențe comparative cu propolis recoltat în regiunea pariziană de către *Apis mellifica*, pe de o parte, și de o colonie de *Meliponula bocandei* în același mediu, pe de altă parte. Rezultatul arată că propolisul recoltat de către albina domestică este de două ori mai activ decât acela recoltat de către meliponă pe două sușe bacteriene *Proteus vulgaris* și *Bacillus subtilis* Caron. În 1963 în Brazilia AZEVEDO și FLECHTMANN au studiat de asemenea substanțele antibacteriene din propolisul de *Apis mellifica* și din materialele utilizate pentru construirea cuibului la Melipone. După acești autori toate extractele posedă una sau mai multe substanțe bacteriostatice; cel mai bun solvent este alcoolul; extractele de propolis ale albinei domestice sunt cele mai inhibitoare, depășesc cu foarte mult cele-lalte extracte. Este important să reamintim că propolisul de *Apis mellifica* recoltat în Brazilia inhibă dezvoltarea lui *B. Subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* și *S. aureus* și, dimpotrivă, extractele sunt total inactive asupra lui *E. coli*.

Așa cum am văzut în cele cîteva exemple citate, extractele de propolis au proprietăți antibacteriene sigure, dar foarte variabile conform originii produsului sau modului de extracție. VERGE și HAMBLETON deja, considerau că propolisul de origini diferite nu avea aceeași compoziție chimică și aceeași valoare antibiotică. Pe de altă parte, eu am găsit că eșantioanele de propolis de proveniențe diferite nu au o valoare antibiotică constantă. Acest fapt este explicabil deoarece originea propolisului este complexă. GHISALBERTI a întocmit un tabel cu cei 34 de constituenți ai săi, izolați de către diferiți autori, în varietăți de propolis de origini geografice diferite, recolțate de către rase de albine diferite și pe plante diferite. În ce mă privește, am lucrat numai cu propolis de origine franceză.

În țara noastră, s-a admis că propolisul provine din muguri de plop; ori, se pare că albinele recoltează propolisul de pe numeroși muguri de arbori pe care-i găsesc în diferite perioade ale anului și nu numai pe salicinae. Cu toate acestea, nu este mai puțin sigur că plopul este sursa cea mai importantă de propolis. De altfel, mugurii de plop sunt singurii care furnizează la extracție un reziduu cu miros caracteristic de propolis. JAUBERT a arătat încă din 1927 înrudirea propolisului cu mugurii de plop care posedă și ei un colorant, chrizina sau 1-3 dioxo-flavona. O altă dovedă a relației strînsă între mugurii de plop și propolis ne-a fost furnizată de lucrările lui VUILLAUME (1958). Acest autor a arătat că extractele de propolis și extractele de muguri de *Populus nigra* inhibau construirea botcilor în colonia de albine.

În rezumat, se poate conchide că numeroasele substanțe identice, odorante, etc., se găsesc în propolis și în mugurii de plop.

M-am gîndit că este util să compar activitatea antibiotică a propolisului din stupi cu aceea din substanțele produse de arborii de pe care albinele au cules rășini.

Extractele de muguri de plop seamănă cu acelea ale propolisului și posedă mai ales un pH apropiat, același miros și se conservă timp de

mai multe luni în frigider. Antibioticul de *Populus nigra* este hidrosolubil, alcoolosolubil și termostabil ca și cel de propolis. Dar asemănarea între cele două corpuri ține în principal de similitudinea lor de acțiune antibiotică asupra unei serii întregi de sușe bacteriene.

Numeiroși autori au considerat că propolisul este diferit de rășinile mugurilor de arbori din cauza adaosului de anumite substanțe de către albine. Un studiu comparativ al diverselor substanțe antibacteriene ale stupului ne-a arătat că nu există nici un fel de relație între substanța glandelor faringiene secretată de către albine și propolis. Rășinile recoltate pe plante sănătoase în mod sigur modificate în stup și de către albină, dar nu este un simplu adaos de secreții ale glandelor insectelor ce intră în joc.

O încercare de izolare și de identificare a substanțelor active conținute în propolis a fost efectuată în colaborare cu BARBIER și echipa sa. Încă de la începutul încercărilor noastre, am constatat că activitatea antibacteriană se datoră prezenței substanțelor flavonoide din propolis (flavone, flavonone). Primul constituent activ pe care l-am izolat în 1964 este 3, 5, 7 trihidroxiflavona sau galangina (VILLANUEVA, BOGDANOVSKI, BARBIER, GONNET și LAVIE). Chrizina a fost izolată din propolis de către JAUBERT în 1927. Noi am confirmat prezența ei ca și cea a tectochrizinei, afară de substanța floroflavonoidă din mugurii de plop izolată de către PICARD în 1873. La rîndul lor, EGGER și TISSUT au identificat și izolat din mugurii de *Populus nigra* două flavonole și o floroflavonă. Este vorba de galangină și de izalpinină, pe de o parte, și de pinocembrină, pe de altă parte. În 1969, am identificat și izolat la rîndul nostru izalpinina și pinocembrina din propolis. Experiențele au demonstrat că pinocembrina reprezintă o două fracțiune bacteriostatică a propolisului după galangină. Dimpotrivă, izalpinina nu manifestă o astfel de proprietate și este inactivă ca și chrizina și tectochrizina.

Ansamblul acestor rezultate ne conduc în mod foarte precis la originea propolisului nostru, deoarece 5 substanțe flavonoide sănătoase sunt comune mugurilor de plop și propolisului. P. POPRAVKO (1977) confirmă această teză și adaugă pe de altă parte că mugurii de mesteacăn conțin substanțe foarte apropiate de aceleale ale mugurilor de plop. Acest autor a efectuat lucrări foarte amănunțite asupra determinărilor și izolărilor corpurilor prezente în muguri și în propolis. 34 de constituenți izolați din propolis de către diferiți autori au fost regrupați în tabelul publicat în 1979 de către GHISALBERTI.

## II. PROPRIETĂȚILE ANTIVIRALE ALE PROPOLISULUI

După POPRAVKO, activitatea antivirală a extractelor de propolis a fost demonstrată într-un număr mare de experiențe. În cadrul primului Simpozion internațional asupra propolisului de la Bratislava, în 1972, s-a prezentat o lucrare foarte interesantă cu acest subiect. BOJNANSKÝ și KOSLJAROVÁ au arătat acțiunea de inhibare a extractelor

de propolis asupra virusului mozaicului tutunului. Lucrări anterioare au arătat că anumite substanțe flavonoide posedau de asemenea o acțiune antivirală asupra sușelor patogene de animale. Se consideră că substanțele active sănt apigenina, acacetina și pectolinaringenina. Primele două substanțe sănt prezente în același timp și în mugurii de plop și în propolis.

### III. PROPRIETĂȚILE ANTIFUNGICE ALE PROPOLISULUI

Singur propolisul are în stup o activitate fungică foarte importantă. Încă din 1960, am remarcat că extractele de propolis împiedicau dezvoltarea anumitor *Penicillium* și *Aspergillus* dacă li se adăugau medii de cultură. Experiențele ulterioare ne-au confirmat că propolisul poseda multe calități reale antifungice. Recent, METZNER și colab. (1975) au arătat că din cei 26 de compoziții ai propolisului, numai pinobankina-3-acetat, pinocembrina, esterul benzilic al acidului cumaric, sakuranetina și acidul cafeic au o activitate antifungică semnificativă.

### IV. PROPRIETĂȚILE FITOCIDE ALE PROPOLISULUI

#### 1) Proprietățile antigerminative ale propolisului în ce privește varietățile de polen

Acum vreo douăzeci de ani nu se cunoștea pentru ce polenul stocat în faguri de către albine nu germina în stup, unde temperatura și higrometria sănt favorabile unui astfel de proces. Se știe că polenul pierde foarte rapid în stup facultățile sale germinative și, după 5 zile de stocaj în celule, nu mai poate germina. Acest polen amestecat cu nectar și cu secrețiile albinelor este depus în alveole și suferă atunci numeroase transformări. Nu este în intenția noastră să expunem aici acțiunea diverselor produse ale stupului asupra sorturilor de polen, dar eu am reluat și completat aceste lucrări (1960). Cu această ocazie, am remarcat că extractele de propolis, netestate de către MAURIZIO, erau de asemenea active pentru diferite specii de polen.

#### 2) Acțiunea fitoinhibitorie și fitocidă a propolisului asupra fanerogamelor

Substanțele care inhibă germinația semințelor sau creșterea plantelor sănt în general asemănătoare din punct de vedere chimic cu anumite antibiotice. Ne-am gîndit să testăm extractele de propolis în ce privește germinația semințelor sau creșterea la plante și tuberculi de cartofi. Prima noastră lucrare publicată în 1960 (GONNET și LAVIE) a marcat începutul acestui studiu asupra fitoinhibitorilor prezenți în pro-

dusele stupului și la albină. GONNET (1966) a completat toate aceste rezultate și a dat lămuriri asupra modului de acțiune a extractelor de propolis asupra plantelor. Experiențe complementare au permis lui GONNET să confirme existența acțiunii fitocide a propolisului brut. El a demonstrat de asemenea că extractele de propolis nu erau de fapt inhibitoare ale germinării, așa cum am arătat noi în mod inițial și așa cum a observat și DEREVICI. Experiențele pe lăptucă „Batavia“ au pus în evidență că extractele de propolis (amestecate cu medii de cultură) blocau sau încetineau creșterea tinerelor plante după răsărire. S-au repetat experiențele pe o întreagă serie de semințe de specii diferite cu aceleași rezultate (rapiță, trifoi roșu, floarea soarelui, creson, griu, etc.). În concluzie, propolisul recoltat de către albine este un inhibitor puternic al creșterii vegetale. Fenomenul rămîne în parte inexplicabil, totuși poate fi avansată o ipoteză: răsinile care stau la baza propolisului și acoperă mugurii anumitor arbori participă fără îndoială la fenomenele de latență, ele joacă un rol inhibitor natural în creștere și împiedică înflorirea prematură a vegetației. Ne rămîne să determinăm grupul de substanțe cărora li se datorează fitoinhibiția. Știm numai că galangina care participă, așa cum am văzut, la acțiunea antibacteriană a extractelor de propolis nu are nici o putere fitoinhibitorie (GONNET, 1966). POPRAVKO (1976) a studiat la rîndul său acest aspect privind propolisul și exudații mugurilor de mesteacăn și a izolat cîțiva compuși fitoinhibitori.

## V. ALTE PROPRIETĂȚI BIOLOGICE DIVERSE ALE PROPOLISULUI

Am trecut în revistă anumite acțiuni biologice ale propolisului ce ni s-au părut interesante și pentru care am efectuat lucrări personale. În același timp, propolisul posedă un anumit număr de alte proprietăți care nu sînt lipsite de interes.

### 1. Proprietățile cicatrizante ale propolisului

Aceste proprietăți au fost utilizate încă din antichitate. Lucrări mai recente confirmă această activitate a propolisului, cum sînt cele ale lui SUTTA și colab., (1975) în Cehoslovacia, care au testat cu succes valoarea extractelor alcoolice asupra rănilor practicate experimental pe oi. Alți autori au arătat eficacitatea acestei substanțe la om în tratamentul arsurilor de gradul doi, dermitelor și eczemelor microbiene (DEREVICI 1966, MORDOUTSEV și colab., 1973, UŠINNIKOV 1965, HACIATUROV, 1969). Plăgile pacienților tratați cu extracte de propolis au arătat un proces favorabil formării epiteliului în comparație cu alte medicamente. Propolisul a fost utilizat pe scară largă în timpul celui de al doilea război mondial în U.R.S.S. grație calităților sale cicatrizante și de regenerare a țesuturilor (HANDROS).

## **2. Proprietățile anestezice ale propolisului**

Proprietățile antialgice ale propolisului au făcut obiectul a numeroase lucrări. PROKOPOVICI și colab., au studiat în 1965 efectul anestezic al acestui produs în soluție alcoolică asupra cornee de iepure. Ei au arătat, ca și alți autori, că efectul său era mai puternic decât acela al cocainei și mai cu seamnă decât acela al procainei. S-a observat de asemenea un efect sinergic al propolisului și al procainei. Alte experiențe au arătat că soluțiile de propolis 1% erau de 4 ori mai eficiente decât procaina, lucru observat în anestezia broaștelor. Autorii au recomandat întrebunțarea propolisului în anestezia locală în cazul intervențiilor chirurgicale dentare. TODOROV și colab. (1968) au conchis pe de altă parte că extractele apoase de propolis posedă o acțiune periferică asupra membranelor oculare mai mare decât cocainea. Alte lucrări au dat rezultate similare și utilizarea practică a extractelor de propolis se efectuează de mai mulți ani, fie în chirurgia dentară fie în chirurgia veterinară în U.R.S.S.

## **3. Proprietățile antioxidantă ale propolisului**

Calitățile antioxidantă remarcabile ale propolisului au fost studiate de către DUŠKALOVA și MURIHNICI (1975) și de către BERNGARD (1976) în U.R.S.S. Autorii au pus în evidență proprietățile antioxidantă ale propolisului, acestea variind în funcție de extracte, de concentrația și de natura produsului de conservat.

## **4. Propolisul și proprietățile sale inhibitorii ale construirii botcilor de către albine**

Așa cum am semnalat deja la începutul lucrării noastre, VUIL-LAUME a studiat în 1958 substanțele inhibitorii pentru construirea botcilor în stupii orfani. Autorul a demonstrat că extractele alcoolice și apoase de propolis, și cele de muguri de plop erau foarte inhibitoare în construirea botcilor. Această proprietate este de o mare importanță pentru comportamentul din interiorul coloniei de albine.

## **5. Toxicitatea propolisului**

Relativ puține cercetări au fost întreprinse pentru a determina toxicitatea propolisului și a extractelor sale. În principal este vorba de cazuri de hipersensibilitate a omului la propolis. BUNNEY (1968) indică că la apicultori se întâlnește un caz de alergie la 2.000. Totuși s-a observat că pacienții care au folosit propolis timp mai îndelungat riscă să aibă probleme de ordin respirator. Este prudent deci să se ia anumite precauții în aplicarea *per os* sau a pulverizărilor și aerosolilor pe bază de propolis. Vor trebui întreprinse studii complementare asupra toxicității propolisului.

Interesul manifestat față de propolis de către numeroși autori în anii din urmă arată că este vorba de o substanță naturală remarcabilă. În primul rînd ea împiedică, într-o oarecare măsură, în interiorul stăpulei, dezvoltarea bacteriilor și a ciupercilor și stagnarea, pe de altă parte, germinarea polenului stocat. De altfel, se pare că, de multă vreme, propolisul a fost utilizat empiric cu succes de către om grație proprietăților sale cicatrizante, antibiotice, antifungice și antialgice. De douăzeci de ani progresul a fost rapid în cunoașterea acestei substanțe și a diverselor sale întrebunțări. Totuși, noi considerăm, la fel cu POPRAVKO (1977) și GHISALBERTI (1979), că trebuie întreprinse multe alte studii asupra propolisului pentru a evita anumite eșecuri ale utilizării sale în domeniul medical. Mai avem nevoie de informații complementare asupra originii vegetale și geografice, a compoziției diverselor sorturi de propolis deși ele sunt relativ similare (POPRAVKO, 1977). Este de dorit o punere la punct a noilor metode de fracționare și de standardizare a extractelor utilizate în dietetică și în farmacie. Nu trebuie de asemenea pierdut din vedere că s-au efectuat puține lucrări relative la toxicitatea propolisului.

Dar interesul suscitat de această substanță este mare și lucrările recente sunt numeroase și juste. De exemplu, merită toată atenția publicația lui RICCIARDELLI D'ALBORE (1979). Autorul a arătat posibilitatea de a utiliza metodele de analiză palinologică pentru a defini originea vegetală și geografică a diferitelor varietăți de propolis, ceea ce ar putea permite o mai bună alegere a eșantioanelor.

În încheiere, aş dori să precizez că, dacă propolisul este o substanță dotată cu proprietăți foarte interesante, nu trebuie exagerată întrebunțarea sa, considerind că el poate vindeca toate suferințele noastre. Un ultim exemplu ne va arăta că trebuie să fim prudenti în extrapolarea anumitor rezultate. Noi am arătat (LAVIE, 1960 și BIZARD, SAURAT, CHANTAL și LAVIE, 1968) că, chiar dacă propolisul și galanga erau active *in vitro* asupra lui *Bacillus larvae*, agent al locii americane, aceste substanțe nu erau capabile să învingă boala atunci cînd s-a încercat tratarea coloniilor de albine în condiții naturale. Un coleg american, LINDENFELSER, a publicat de altfel o lucrare cu același subiect, ajungînd la aceleași concluzii *in vitro* : propolisul nu poate să ferească stupul de infectarea cu *Bacillus larvae*.

## ASPECTE FIZICO-CHIMICE, BACTERIOLOGICE ȘI FARMACODINAMICE PRIVIND PROPOLISUL

M. MARIN  
ROMÂNIA

În vederea utilizării propolisului și preparatelor pe bază de propolis în scop medical se impun cercetări farmacodinamice, farmacologice, farmacochimice, bacteriologice, etc. pentru a fundamenta științific multi-

plele lui acțiuni. În acest scop au fost întreprinse cercetări ale căror rezultate le relatăm în continuare.

Opiniem că cercetările asupra propolisului să se facă pe omogenat de propolis, recoltat dintr-o zonă geografică mare (regiune, țară) intrucit în practica producерii medicamentelor, realităile impun să fie produse cu propolis de colectură și numai acesta poate fi standardizat.

### Cercetări fizico-chimice

— *Determinarea punctului de topire* — pentru determinarea punctului de topire s-a folosit metoda tuburilor capilare. Determinările repetate au condus la concluzia că punctul de topire al propolisului (cu această metodă) este de 81—83°C.

— *Radiotransparență* — propolisul brut, propolisul purificat (extract spiss), soluția alcoolică și emulsia apoasă sunt ușor radioopace fapt demonstrat radioscopic și radiografic.

— *Solubilitate* — Propolisul este practic insolubil în apă. Este solubil în alcool etilic concentrat, alcool-eter, eter, acetonă, benzen, propilen glicol, parțial în uleiuri vegetale. Este solubil în alcalii și insolubil în acizi.

Solventul cel mai util pentru necesitățile practice este alcoolul etilic concentrat — 95°.

În timpul solventării (24 ore) se procedează la agitări repetitive. După lîmpezire se face decantarea soluției de alcool propolizat. Soluția de alcool propolizat (tinctură) se concentrează în vid pînă la obținerea unui extract moale (spiss). În scopuri de laborator concentrarea se poate face și cu un curent de aer la temperatura camerei.

Extractul moale obținut se solubilizează bine în solvenții mai sus menționati.

— *Prepararea emulsiei de propolis* — Emulsia de propolis este foarte utilă în scopuri experimentale în farmacodinamie, bacterioologie și în cele de farmacoterapie.

Cea mai bună și stabilă emulsie se prepară din soluția alcoolică de propolis cu apă distilată.

Serul fiziologic și apa obișnuită formează cu soluția alcoolică de propolis emulsii puțin stabile.

Pentru cercetările de laborator și practica terapeutică se consideră propolisul concentrat — spiss. 100%, iar concentrația de alcool din emulsiei se calculează realizând diluțiile după tabelul de diluții alcoolice din farmacopee.

Investigațiile noastre au arătat că în prezența serului sanguin, emulsiile de propolis își păstrează multă vreme stabilitatea. Acest fapt este important atât pentru sudiile farmacodinamice, cât și pentru terapeutică.

## Cercetări bacteriologice

Au fost efectuate antibiograme prin metoda cupelor în agar obținându-se rezultatele menționate în tabelul următor :

Nr.	Denumirea germenului	Emulsie propolis (alc. 10°)	Alcool 10°	Miere pro- polizată (sol. alc. 10°)	Miere simplă
1	Staphylococcus aureus	+++	—	++	+
2	Streptococcus	+++	—	+++	+++
3	B. anthracis	+++	—	++++	+
4	Erysipelothrix rusihopazhiae	+++	—	0	0
5	B. coli	—	—	++	++
6	Streptococcus apis	—	—	0	0
7	B. alvei	—	—	0	0
8	B. larvae	—	—	0	0
9	B. combicis	±	—	0	0
10	Streptococcus bombicis	±	—	0	0

+= 2—3 mm de la marginea cupei

+++= 20—25 mm de la marginea cupei

++= 3—5 mm de la marginea cupei

0 = necercetat

+++ = 5—20 mm de la marginea cupei

— = negativ

## Cercetări farmacodinamice :

Toleranța pe cale generală, *per os* și intravenos.

Injectindu-se la iepuri pe cale intravenoasă cîte 5 ml emulsie propolis (alcool 10°), timp de 7 zile, animalele au suportat substanța fără modificări clinice.

Injectarea la cai, cîte 50 ml emulsie de propolis (alcool 10°), pe cale intravenoasă a condus numai la o ușoară accelerare a pulsului și respirației, aceasta avînd și o amplitudine mărită.

Cercetările histologice efectuate la cîinii injectați intravenos, cu emulsie alcoolică de propolis (10° alcool), cîte 10 ml, timp de 7 zile, au pus în evidență focare de necroză.

Administrarea *per os* la cîini, cîte 100 ml emulsie de propolis (alcool 10°) timp de 7 zile nu a condus la modificări în starea generală.

— Acțiunea emulsiei de propolis (alcool 10°) pe cale intravenoasă, în cantitate de 2,5 și 5 ml la cîinii narcotizați cu cloraloză, a determinat o scădere a tensiunii arteriale și creșterea în amplitudine a respirației.

— În caz de narcoză profundă cu instalarea apneei, respirația a fost redresată prin injectarea intravenoasă a 5 ml emulsie de propolis.

— Asupra cordului de broască „*in situ*“ emulsia de propolis are acțiune cronotropă negativă (rărirea contractiilor) și inotropă pozitivă (mărire puterii de contracție a mușchilor cardiaci). Martorii cu alcool nu au manifestat decât un ușor cronotropism negativ.

— Asupra duodenului izolat de iepure emulsia de propolis a acționat prin diminuarea tonusului și amplitudinii.

Cercetările efectuate pun în evidență o parte din acțiunile bacteriostatice și farmacodinamice ale propolisului și servesc explicării științifice privind utilizarea propolisului în diferite domenii ale apiterapiei.

## Capitolul III.

# CERCETARI EXPERIMENTALE ASUPRA PROPOLISULUI

EFFECTELE INHIBITORII ALE PROPOLISULUI  
ASUPRA UNOR VIRUSURI ALE PLANTELOR

V. BOJŇANSKÝ  
V. KOSLJAROVÁ  
ČEHOSLOVACIA

Propolisul este utilizat de albine pentru etanșeizarea stupului, netezirea și lustruirea pereților celulelor din faguri, întărirea ramelor, polopizarea animalelor sau insectelor moarte pe fundul sau pe pereții stupului. La producerea lui contribuie diferite cleiuri, rășini și substanțe colorante, pe care albinele le culeg din natură și le duc în stup, precum și particule nedigerate din grăuncioare de polen, ceară și substanțe minerale.

Culoarea propolisului este variată: verde, verzui-castanie, maro-nie, galben-maronie, brună pînă aproape de negru. Propolisul are o densitate mai mare decît a cerii de albine, iar dacă este pus în apă se scufundă. Este insolubil în apă și numai parțial solubil în alcool; se dizolvă ușor în eter și cloroform. La temperaturi mai ridicate se înmormă și devine lipicios. Se topește la 60—69°C.

Propolisul are puternice efecte bactericide și bacteriostatice. Mișcările cadavre din stup învelite în propolis nu putrezesc. Acțiunea propolisului se datorează în mare măsură compozitiei sale chimice. Efectele sale anestezice sunt excepționale: de 3,5 ori mai mari decît ale cocainei și de 5,2 ori mai mari decît ale novocainei. Pentru aceste calități propolisul își găsește largi utilizări în medicina veterinară și umană (CURYLO, 1970).

În virologia vegetală, unde se pune de asemenea problema agenților patogeni, nu există, pînă în prezent, informații referitoare la experiențe cu propolis. De obicei, se lucrează cu inhibitori — substanțe care suprimă infecția, sau reduc înmulțirea virusului în celulele plantei afectate. Este vorba de substanțe de natură atît organică cît și anorganică, pure din punct de vedere chimic, precum și de substanțe cu caracter complex, nedefinite din punct de vedere chimic. Printre cele din urmă

se numără, mai ales, extractele din diferite specii de plante, tratamentele cu lapte acru și.a. Putem clasifica propolisul printre substanțe cu caracter inhibitor.

### Metodă și rezultate

Pentru scopurile noastre experimentale, ne-am procurat propolis de la un apicoltor din Bratislava. Am preparat o soluție 10% agitând timp de 30 de minute un flacon cu etanol 25% și propolis. Soluția a fost lăsată în repaus timp de 24 ore, apoi a fost agitată din nou și filtrată prin tifon, pentru a se înălătura impuritățile grosiere. După stabilizare, s-a instalat o culoare castaniu închis. Soluția de propolis astfel obținută a fost conservată la adăpost de lumină, la o temperatură de —3 pînă la 9°C.

Pentru experimentele cu propolis am utilizat trei specii de virusuri : virusul mozaicului castravetelui, izolat din *Phytolacca americana* (KOSLJAROVÁ, BOJNANSKÝ 1972), virusul pătării tutunului și virusul necrozei tutunului, izolat din salba moale (*Evonymus europaea*) — (BOJNANSKÝ și KOSLJAROVÁ, 1968). Pentru primele lucrări am folosit o soluție de 10% de popolis în etanol 25%.

În prima experiență am utilizat diferite moduri de aplicare, după cum urmează :

a) inocularea frunzelor de fasole (*Phaseolus vulgaris*) albă cu virusul mozaicului castravetelui sau cu virusul pătării tutunului, eventual inocularea frunzelor castravetelui (*Cucumis sativus* cv. *delicates*) cu virusul necrozei tutunului, iar după 5 minute — aplicarea unei soluții de 10% propolis pe frunzele inoculate ;

b) aplicarea, pe frunzele de fasole sau pe frunzulițele germinative ale castravetelui, a unei soluții de propolis 10% iar după 5 minute — inocularea cu virusul corespunzător ;

c) amestecarea inoculului de virus cu o soluție de propolis 10% în proporție de 1 : 1 ;

d) inoculul de virus de control (martor), fără utilizarea propolisului,

Sensibilitatea cea mai redusă a fost evidențiată pentru virusul mozaicului castravetelui, iar cea mai ridicată — pentru virusul necrozei tutunului. Procedeul de inoculare a virusului plus aplicarea ulterioară a propolisului a prezentat eficiență minimă. În cazul acestui procedeu, numărul de leziuni de pe frunze a fost redus cu 20—25% în comparație cu martorul. Mai eficientă s-a dovedit aplicarea amestecului de virus + soluție de propolis pe frunzele de fasole și pe frunzulițele germinative ale castravetelui, prin aceeași operație, imediat după amestecarea celor două componente. Prin acest procedeu, numărul leziunilor s-a redus cu 36—62%. Efectul maxim a fost asigurat de aplicarea soluției de propolis pe frunzele plantelor testate, urmată, la interval de 5 minute de inocularea cu virusul corespunzător. În acest caz, numărul leziunilor a scăzut cu 62—85%.

În cazul celei de-a două experiențe am utilizat virusul cu cea mai mare sensibilitate, respectiv virusul necrozei tutunului, precum și cel mai adekvat procedeu de aplicare — aplicarea pe frunzulițele germinative ale castravetelui a unei soluții de 10% propolis și, apoi, inocularea cu virus. În comparație cu martorul, am obținut o reducere de circa 57% (graficul 2, A). Virusul necrozei tutunului a provocat, pe frunzulițele germinative ale castravetelui, leziuni necrotice cu caracter pronunțat local și ușor numărabile, dar virusul a pătruns în întreaga plantă. Prin aceasta am intenționat să verificăm cît de rapid ajunge și se reproduce virusul în rădăcini, tije, frunzulițe și frunzele castravetelui. În scopul amintit, am efectuat o nouă inoculare (după 17 zile), folosind sucul extras din diferite părți de plănuță, atât din materialul martor cît și din cel căruia i se administreză propolis.

În rădăcinile materialului tratat cu propolis s-a înregistrat o cantitate de virus de circa 12 ori mai mică decît în rădăcinile materialului martor. În tijele materialului tratat s-a evidențiat o cantitate de circa două ori mai redusă de virus, comparativ cu frunzulițele germinative ale materialului martor. În frunzele adevărate ale castravetelui nu a mai fost înregistrată prezența virusului — în cazul materialelor tratate cu propolis, în timp ce în materialul martor a apărut, chiar dacă în cantitate relativ redusă, respectiv circa 5% față de frunzulițele germinative ale materialului martor.

A treia experiență a fost efectuată tot cu virusul necrozei tutunului, pe frunzulițe germinative de castravete. Scopul experienței a fost să se determine posibilitățile de diluare a propolisului, eventual reducerea efectului propolisului în funcție de sporirea diluării. Prima parte a experienței a fost efectuată cu concentrații mai mari, respectiv 10%, 1% și 0,1%, în trei serii successive. Cea de-a două parte a testului s-a realizat cu concentrații inferioare, respectiv  $10^{-2}$  pînă la  $10^{-8}$ , în două serii successive. În comparație cu materialul martor, am obținut, în aproape toate cazurile, o diminuare sub 50%.

În cursul celei de a patra experiențe am folosit virusul clasic al mozaicului tutunului, care prezintă particule virale în formă de bastonaș. Au fost utilizate două specii de tutun, respectiv *Nicotinia rustica* și *Nicotinia glutinosa*, pe frunzele cărora virusul inoculat formează leziuni necrotice ușor vizibile. La *N. rustica*, frunzele au fost tratate cu o soluție de propolis în concentrație de  $10^{-5}$ , iar după un interval de 24 de ore s-a inoculat virusul mozaicului tutunului. În cazul *N. glutinosa*, virusul a fost inoculat abia după trecerea a 48 de ore.

În primul caz al acestei serii de experiențe, numărul de leziuni a scăzut cu 65,5%, în cel de-al doilea caz — cu 56,3%, ceea ce corespunde în mare (înînd seama de inocularea tardivă a virusului după administrarea propolisului) efectului inhibitor al propolisului asupra virusului sferic al necrozei tutunului.

În cadrul celei de-a cincea experiențe am verificat sensibilitatea propolisului, eventual menținerea efectului său inhibitor asupra virusurilor plantelor, în urma unor încălziri cu intensitate și durată diferite.

In cursul experienței s-a lucrat cu două virusuri, respectiv cel al necrozei tutunului și cel al pătării tutunului întrebucințindu-se temperaturi de 60°C, 80°C și 100°C, timp de 5, 10, 20, 30 și 60 minute.

Propolisul în concentrația de  $10^{-5}$  a fost încălzit o anumită durată de timp la temperatura corespunzătoare în eprubete cu pereți subțiri, pe o baie de apă, iar înainte de administrare a fost răcit sub un jet de apă curentă. Ca material martor au fost utilizate plante netratate cu propolis.

Eficacitatea propolisului a fost minimum afectată la temperatura de 60°C și maximum la temperatura de 100°C. La virusul pătării tutunului, o încălzire de scurtă durată (20 minute) la temperatura de 80 și 100°C a redus eficacitatea propolisului mai mult decât încălzirea timp de 60 minute. În cazul virusului necrozei tutunului s-a observat un efect asemănător la încălzirea timp de 10 minute (la 80°C), eventual timp de 20 minute (la 100°C). În concluzie, se poate afirma că propolisul își păstrează în mare parte efectul inhibitor asupra virusurilor, chiar și după ce a fost supus o perioadă mai îndelungată la temperaturi înalte, ceea ce înseamnă că efectul inhibitor al propolisului se distinge printr-o mare stabilitate.

### Discuții

Pînă în prezent nu au existat informații despre utilizarea și experimentarea efectului propolisului asupra virusurilor plantelor. Presupunem că rezultatele noastre constituie primele informații în acest sens.

Propolisul utilizat a demonstrat, fără echivoc, efectele sale inhibitorii asupra tuturor celor patru fito-virusuri care s-au experimentat, și aceasta într-o proporție remarcabilă. Trei specii de virusuri posedă particule sferice, dar, în poftida acestei asemănări, se pare că sensibilitatea lor este diferită. Cea mai mare sensibilitate a fost demonstrată de virusul necrozei tutunului, iar cea mai redusă — de virusul mozaicului castravetelui, respectiv de tulipina acestuia izolată din *Phytotolacca*; cel de-al patrulea virus are particule în formă de bastonăș și se pare că sensibilitatea sa la propolis este aproape similară celei a virusului sferic al necrozei tutunului.

Rezultatele demonstrează în mod clar nu numai că propolisul reduce numărul de leziuni pe frunzele inoculate cu virus, dar și că inhibă în mod vizibil reproducerea virusului în întreaga plantă.

Pentru moment nu este posibil să explicăm efectul mai pronunțat al concentrațiilor reduse (rezultatele optime au fost dobîndite cu concentrații de  $10^{-3}$  —  $10^{-7}$ ). A fost vorba, în aceste cazuri, fie de influență stării fiziologice a plantelor (experiențele au fost efectuate succesiv, nu simultan), fie de cea a mediului, fie de un alt factor necontrolabil. Totuși, din ultima experiență se poate desprinde concluzia că propolisul își menține eficiența chiar și la concentrații foarte reduse, ceea ce ar putea prezenta o deosebită însemnatate practică în cazul unei eventuale utilizări cu scopul de a proteja culturile mai sensibile,

mai ales cele de seră, răsadurile și, în general, plantele tinere. Efectul inhibitor al propolisului asupra virusurilor are o remarcabilă stabilitate care se menține într-o măsură apreciabilă și în cazul încălzirii la temperaturi mai înalte.

### Rezumat

Experiențele preliminare efectuate cu propolis au demonstrat existența unor efecte inhibitorii deosebit de impresionante asupra a trei specii de virusuri sferice — respectiv virusul mozaicului castravetelui, izolat din *Phytolacca americana*, virusul pătării tutunului și cel al necrozei tutunului, precum și asupra virusului cu bastonașe al mozaicului tutunului. Propolisul reduce nu numai numărul de leziuni de pe frunzele inoculate, dar în același timp, inhibă de manieră vizibilă, reproducerea virusului în întreg organismul plantei. Propolisul a manifestat o înaltă eficiență și în cazul unor concentrații reduse, ceea ce ar putea prezenta o importanță pentru utilizarea practică a acestei substanțe în acțiunile practice de ocrotire a culturilor.

### B I B L I O G R A F I E

- V. BOJNANSKY, V. KOSLJAROVÁ : Evonymus mosaic. — Biol. Plant. 10, 322—324 (1968).  
CURYLO, J. : Propolis jeho složení, vlastnosti a praktické využití, Odborné vělařské preklady 4, 57—58 (1970)  
PSZCZELARSTVO, 10, 6, (1968).  
V. KOSLJAROVÁ, V. BOJNANSKY : Attemp to characterize a virus isolated from *Phytolacca americana* in Czechoslovakia. Plant Virology Proc. 7th Conf. Czechoslov. Pl. Virol., High Tatras, 1971.

### CONTRIBUȚII LA STUDIUL PROPOLISULUI

#### A. CERCETĂRI CHIMICE și FIZICO-CHIMICE „IN VITRO“ ȘI „IN VIVO“ CU PROPOLIS

Adelina DEREVICI  
ROMANIA

### Introducere

În ultimele decenii terapia cu propolis a luat un avînt deosebit, datorită rezultatelor favorabile obținute în diferite boli, fapt ce reiese din comunicările în cadrul congreselor și simpozioanelor de specialitate\*.

O parte din acestea au fost reunite în volumul „Propolis“, apărut în editura APIMONDIA în 1975.

Volumul reprezintă o sursă prețioasă de informare cuprinzînd lucrări originale despre variate probleme. Printre acestea consider foarte

\* Cei interesați pot găsi bibliografia la redacție și la autor.

utile lucrările de biologie și clinică, completate cu o documentare despre preparate din propolis.

Lucrările lui BRAILEANU, VELESCU, MARIN deschid drumul spre posibilitatea de standardizare a diferitelor forme de folosire a propolisului ca „medicament“ după normele sanitare legale din țară.

În această direcție ne-am străduit și noi să contribuim la lărgirea cunoștințelor asupra proprietăților propolisului și asupra flavonoizilor, componentul său principal. În acest scop am inițiat cercetări cu diferiți colaboratori, biologi și chimici. Rezultatele le prezentăm în această lucrare de sinteză care cuprinde :

- 1) Cercetări chimice și fizico-chimice ;
- 2) Cercetări „*in vitro*“ și „*in vivo*“

### **1) Cercetări chimice și fizico-chimice**

a) Într-o primă serie de cercetări în colaborare tehnică cu SORU au fost determinate unele caracteristici chimice ale propolisului. Utilizarea a diferiți solvenți a permis stabilirea existenței unor fracțiuni solubile în cloroform, după vaporizarea căruia rămâne un reziduu în proporție de 90,36 la 100 g.

În extractele cloroformice se solubilizează lipide, componente de culoare brună de asemenea și compuși cărora li se atribuie miroslul de extracție cu metanol care după evaporare lasă de asemenea un reziduu de 4,73 g la sută. O a treia extracție după cele două precedente e cea mai redusă (3,16 g la 100).

Totalitatea acestor trei reziduuri este de 98,25 g la 100 propolis. Azotul total al acestuia e de 0,400 g la 100 g produs nativ de propolis. Hidroliza acidă a acestuia permite punerea în evidență prin cromatografie descendantă pe hârtie Whatman a opt aminoacizi și anume : 1) serină, 2) glicocol, 3) acid aspartic, 4) acid glutamic, 5) alanină, 6) triptofan, 7) fenilanină și 8) leucină. De remarcat că trei din aceștia sunt aminoacizi esențiali.

În extractul apăs, la cald, al propolisului, tehnicele colorimetrice pentru flavonoizi au dat rezultate pozitive.

b) Alte cercetări chimice și fizico-chimice asupra propolisului sunt efectuate de BOIERU și DEREVICI care folosesc reziduul cloroformic obținut în lucrarea precedentă sau propolis brut. Reziduul cloroformic reluat cu acetonă și apoi cu metanol supus cromatografiei circulare prezintă 11 spoturi.

Propolisul brut epuizat cu diferiți solvenți organici, supus electroforezei în gel poliacrilamidă, prezintă 9 fracții.

Cu reacții chimice pozitive se semnalează reacțiile colorimetrice pentru flavonoizi și aceea cu orcinol.

c) GROZA, BLOOS, DEREVICI utilizând aparatul japonez automat pentru determinarea aminoacizilor în circuit închis, identifică pe hidrolizat acid de propolis 8 acizi aminați și anume : 7 aminoacizi esențiali, al 8-lea, triptofanul, nu e identificat cu acest aparat.

Propolisul brut utilizat în experiențele noastre provine din diferite regiuni ale țării. Cităm unele contribuții ale cercetătorilor care determină flavonoizii din plante indigene. TAMAS cercetează arbuscul de afine (*Vaccinium myrtillus* și *Vaccinium vitis idaeae*), MIHELE din *Hieracium auranticum* (rusușita) CONSTANTINESCU și colab. din *Inula uliginosa*.

CRISTEA și colab. pun în evidență în extractul alcoolic de *Tilia argentea* un număr de 17 acizi aminați. După cum se știe, alcoolul extrage flavonoizii.

În concluzie, din aceste lucrări ale noastre reiese complexitatea structurii propolisului, identificarea fracțiunilor semnalate necesită continuarea investigațiilor.

## 2) Cercetări in vitro și in vivo cu propolis

În aceste cercetări, DEREVICI, POPESCU și POPESCU utilizează o suspensie hidroalcoolică de propolis pregătită 1/10 cu extract etanic. Aceasta este obținut macerând fragmente mărunțite de propolis brut în proporție de 25 g la 100 alcool de 85°C. Se folosesc flacoane de culoare brună, închise ermetice, ce se mențin la temperatură camerei, agitându-se în decurs de cinci zile de mai multe ori pe zi. După acest interval nu se mai agită, se lasă să se depună particulele insolubile în alcool și impuritățile. Se obține un lichid maroniu limpede, pe care îl conservăm în sticle de culoare brună, bine închise, ferite de lumină și căldură. Pentru a cunoaște cantitatea de substanță activă, se determină reziduul la greutate constantă la 100 ml extract. Aceasta variază în diferitele probe între 8—10 g la sută extract. În felul acesta cunoaștem doza de substanță activă, utilizată pentru prepararea emulsiei hidroalcoolice care are un aspect lăptos uniform. (Atragem atenția să nu se folosească ser fiziologic căci rezultă precipitate).

În mod curent mai evaporăm la 2/3 din extractul alcoolic, iar martorii din experiențe primesc concentrarea corespunzătoare pe alcool etilic.

DEREVICI, POPESCU și POPESCU stabilesc toleranța a 1,05 g/kg corp substanță activă pentru șoareci, cobai, iepuri.

Albinele hrănite cu miere în amestec cu 20% emulsie hidro-alcoolică prezintă fenomene paralitice, urmate de moarte.

Doza corespunzătoare de alcool nu e toxică pentru albine martore. Proprietățile antibiotice ale propolisului au fost stabilite față de unele specii și colibacili, *B. disenteric* și *B. tifici*, nu însă față de stafilococ Oxford și *S. subtilis mesentericus*.

Pentru titrarea puterii antibiotice acești cercetători propun folosirea tehnicii diluțiilor limită față de *Pasteurella avis*.

Albinele infestate prin hrânire cu miere-polen de porumb mucegăit cu *Aspergillus niger* și *Mucor mucedo*, nu sunt protejate de propolis. În abdomenul acestor albine apar sporangi și hife, deși propolisul glandular există în macroclenocitele din hemolimfa albinelor.

Substanțele volatile emanate din stupul populat cu albine au acțiune inhibitoare asupra aeroflorei din proximitatea stupului.

Numărul colonilor cultivate pe geloză sau pe mediul Czapek pentru mucegaiuri e redus față de cel al culturilor obținute la distanță de două sute de metri de stup, în livadă sau în oraș.

Acțiune inhibitorie posedă emulsia hidroalcoolică de propolis și asupra germinării semințelor de cîneapă, precum și asupra cultivării virusului gripal pe ouă embrionate. Aceste rezultate diferă de acel al mărtorilor la care se utilizează cantități similare de alcool diluat.

DEREVICI, POPESCU au studiat acțiunea propolisului asupra celulelor tumorale ale ascitei Ehrlich. Contactul direct a acestor celule tumorale cu emulsia hidro-alcoolică de extract de propolis le imprimă un aspect modificat progresiv, în raport cu durata contactului. După 1 oră de contact la 37°C citoplasma capătă o dispoziție veziculară în jurul nucleului alterat. Celulele apar acoperite de un material amorf, care maschează structura și le aglomerează. Modificările morfologice sunt mult mai marcate după trei ore de contact, materialul amorf înglobează majoritatea celulelor într-o pătură rugoasă. Aceste aspecte au fost stabilite la microscopul cu contrast de fază sau pe materialul fixat și colorat cu metoda May-Grünwald-Giemsa.

În experiențe „*in vitro*“ pe șoareci, DEREVICI, SORU, DIMA (20) constată acțiunea inhibitorie a emulsiei hidroalcoolice de propolis asupra vitalității celulelor tumorale Ehrlich. Pasagiile în serie cu lichid ascitic provenit de la animalele supraviețuitoare în primul pasaj, rămân sterile, în același timp afinitatea tinctorială a celulelor de inoculare este scăzută.

În continuarea cercetărilor asupra reactivității organismului sub influența propolisului, am inițiat o serie de experiențe pe cobai și pe iepuri. În colaborare cu ZALMANOVICI și ARDELEANU am urmărit efectul în diferite condiții experimentale descrise de FILOTTI în experiențele pe cobai, animalele injectate zilnic timp de 12 zile primesc 100 mg substanță activă, diluată în 10 ml apă distilată (total 1200 mg). În experiențele pe iepuri supuși imunizării, cu antigen *Salmonella paratyphi* AO, pe cale intravenoasă, în 5 sedințe se administrează emulsie hidroalcoolică de propolis pe cale intraperitoneală (total 500 mg substanță activă). Martorii primesc injecții cu aceeași cantitate de alcool în apă distilată fără propolis. Din aceste experiențe nu a reieșit o stimulare a proceselor imunitare de creștere a anticorpilor antiparatifici. A.O. și nici o creștere a titrului alexic.

Examenul leucogramei animalelor de experiență indică o creștere a polinuclearelor neutrofile, contribuția cobailor fiind predominantă. Limfocitele scad, iar monocitele se echilibrează.

După sacrificarea acestor animale se fac prelevări de mezenter după tehnica Boquet și Delauney (2). După fixare și colorare recurgem la examen microscopic pentru a preciza etapele transportului de la locul inoculării și a procesului de „clearance“ a propolisului.

Din imagini rezultă că particule ale emulsiei coloidale hidroalcoolice de propolis sunt antrenate de celulele endoteliale capilare și apar sub formă de granule, înconjurate de un halo. După o serie de etape se fă-

rîmîtează în granule mărunte, macrofagele intervin în metabolizarea lor, apar vacuole digestive aparente intracitoplasmic. Lucrarea DEREVICI, ARDELEANU, ZALMANOVICI se ocupă de rezultatele examenului histologic al organelor acelorași animale. Semnalăm că în secțiunile examinate nu apar granule de propolis, aşa cum s-a constatat în organele șoarecilor care au primit propolis *per os*. La aceștia s-a înregistrat de asemenea un ușor grad de degenerescență grasă. Aceasta sugerează o reactivitate de specie diferită, de asemenea și importanța modului de administrare.

O deosebită atenție s-a acordat în cursul examenului histologic de pistării unor eventuale modificări morfológice de ordin teratogen. Rezultatul exclude asemenea aspecte; de altfel, același rezultat a fost obținut în colaborare cu ATHANASIU, PETRESCU, STOIAN la examinarea secțiunilor din organele puilor de hamster inoculați la 48 ore de la naștere cu emulsie hidroalcoolică de propolis. Acest examen a fost efectuat după șase luni de la inoculare, perioadă în care nu au apărut leziuni macroscopice cutanate la puii de hamster supravegheata în tot acest interval.

## B. EXPERIMENTARE ȘI DEDUCȚII ASUPRA MECANISMULUI DE ACȚIUNE A COMPONENȚEI FLAVONOIDICE

În această comunicare, ne ocupăm de o importantă componentă a propolisului, anume grupa flavonoizilor, pe care o cunoaștem din cercetările chimistilor.

Dezvoltarea centrelor de documentare și cercetare a industriilor farmaceutice a creat posibilitatea realizării unor studii experimentale cu caracter riguros științific pentru cunoașterea acestor produse. Utilizarea terapeutică empirică a acestora a precedat pe cea a informării asupra structurii și reacțiilor determinante în organism.

În lucrările noastre, în colaborare cu chimist, am stabilit complexitatea structurii propolisului și componente sale flavonoidice: conține glucide, protide și lipide, ceea ce ar explica posibilitatea integrării sale în metabolismele fiziologice.

După părerea lui SWAIN flavonoizii intervin într-un procent de 36% în vegetalele alimentare.

Din documentarea asupra experimentării apar variantele aspecte sub care a fost cercetată componenta flavonoidică, existentă și în propolis (6).

VILLANUEVA și colab. au izolat din propolis unii flavonoizi și din lucrările lor rezultă un paralelism al curbei spectrografice cu flavonoizi de sinteză. Din determinările lui HEINEN și LINSKENS a acizilor grași din propolis și compararea cu rășina mugurilor de plop reiese asemănarea curbelor cromatografice. Acest rezultat relevă una din sursele importante de care se servesc albinele la prelucrarea acestui produs natural cu acțiune asupra circulației periferice.

Interesul asupra grupului flavonoidic a fost relevat în lucrările lui SZENT GYÖRGY care a obținut cu suc de citrice rezultate bune la tra-

tarea manifestărilor scorbutice, îndeosebi asupra celor hemoragice. Aceasta conține pe lîngă vitamina C și un alt factor cu care lucrează sinergic și pe care l-a denumit vitamina de permeabilitate (P) sau citrină.

Noțiunea de vitamină a fost infirmată de unii cercetători și înlocuită cu denumirea de bioflavonoizi sau derivați flavonoidici. După părerea lui PARROT și CANU și în baza lucrărilor lui GAZAVE se consideră mai adekvat termenul de „factor C<sub>2</sub>“ spre a se sublinia sinergismul acțiunii sale cu vitamina C.

În acțiunea lor asupra rezistenței capilarelor, ambele fracțiuni din citrină înscriu o curbă bifazică, prima de tip adrenalinic, care durează 24 ore și a doua care survine după 72 ore (se menține mai multe zile).

### **Proprietățile flavonoizilor**

În studiile consacrate acestui grup se insistă asupra activității caracteristice de a reduce fragilitatea și permeabilitatea capilarelor.

Acțiuni simultane a numeroși factori intervin în funcțiunea rețelei terminale vasculare. Ea este reprezentantă prin capilare, arteriole venoase și limfatice răspândite în toate teritoriile organismelor.

Structura anatomică a capilarelor considerată simplă în urmă cu ani (24) e în realitate complexă morfologic și funcțional. După noile noțiuni, membrana celulelor nu e o formăriune statică, ea este o pătură limitantă lipido-proteică în continuu dinanism. Aceasta nu are numai rol de conținere, dar intervine activ în menținerea raporturilor intercelulare și de schimburi cu fluidul intersticial.

Complexitatea proceselor ce au loc în capilar reiese din aspectul de unitate cu venele limfaticice, capilarele și terminațiile nervoase din patul capilar.

Elemente de structură diferite separă plasma sanguină de lichidul extracelular. Rezultă că studiul produsului de care ne ocupăm, flavonoizii, nu poate fi limitat la pereții vasculari, ci trebuie să se extindă asupra biosferei funcționale a patului microcelular, unde mastocitele perivasculare și nervii formează o entitate funcțională cu micile vase. În patul capilar intervin mediatoare chimice de care depinde condiția hemodinamică periferică normală, integritatea de filtrare și motricitatea capilarelor. Acestea reprezintă locul de schimburi între singe și țesuturi, asigură apportul de elemente nutritive și eliminarea deșeurilor, funcțiuni ce implică un reglaj foarte precis de mecanisme, coordonate de sistemul nervos central.

### **Metabolizarea flavonoizilor**

În continuarea expunerii vom analiza contribuția experimentatorilor la lămurirea metabolismului flavonoizilor, introdusi în organism pe diferite căi.

Experimentatorii au folosit diferiți derivați flavonici, noi însă ne preocupăm global de grupul acesta, indiferent de individualitatea produsului folosit.

S-a pus întrebarea : care este soarta flavonoizilor administrați omului sau animalelor ? GRIFFITH și BARROW consideră că flavonoizii suferă o serie de scindări sub influența florei intestinale. Se obțin aceiași compuși fenoli lucrând *in vitro* numai cu flora microbiană.

Experiențele pe animale crescute în condiții de sterilitate conduc la concluzii asemănătoare. DAS și SOUTHY menționează de asemenea în lucrările lor rolul microflorei intestinale în catabolizarea flavonoizilor.

GRIFFITHS și BARROW utilizează în cursul experiențelor un produs semisintetic care conține trei derivați flavonoidici de structură diferită, așa cum reiese și din cromatografiile efectuate de MATAGNE care constată apariția metaboliților la şobolanii injectați intraperitoneal. Ei conchid că în procesul scindării intervin enzime hepatice, iar căile biliare constituie o cale de eliminare a metaboliților rezultați. În aceste experiențe s-a folosit canularea căilor biliare, ceea ce a permis prelevări de bilă în parcursul experienței. BOOTH și colab. plecând în cercetările lor de la acidul cafeic, remarcă o serie mare de produși de catabolizare ce apar în parcurs și apoi sănă eliminați prin urină sub formă de compuși fenolici.

Unele diferențe rezultă după specia animalelor folosite și după calea de administrare a derivatelor flavonoidice. Se crede că există posibilitatea de a evalua gradul catabolizării după cantitatea de compuși fenolici eliminați prin urină sau fecale și a stabili un index de absorbție în unitatea de timp. Determinările în singe indică cifre superioare de metaboliți în cazul administrării flavonoizilor pe cale parenterală.

În cursul metabolizării, eliminarea e repartizată între bilă și căile urinare.

Produsul semisintetic „Venoruton“, care conține derivați ai rutozidului de diferită solubilitate, denumit „Paroven“ e rezistent la sucul gastric, dar e hidrolizat de microorganismele florei intestinale infierioare. TAKACS și colab. nu sănă de acord asupra intervenției florei intestinale în catabolizarea flavonoizilor. Ei ajung la această concluzie în baza rezultatelor din experiențele pe ficat izolat de circulația generală și întreținut prin perfuzare cu un lichid fiziologic căruia i-sau adăugat flavonoizi.

SIMPSON și colab. au cercetat metabolizarea flavonoizilor de către microflora din rumen pe care îl consideră ca o sursă bună a florei microbiene cu care obțin degradarea flavonoizilor în condiții anaerobe. Rezultatul cu flora din rumen dispără prin filtrare prin filtre Seitz.

BÖHM citează în monografia sa asupra flavonoizilor un număr de autori care au cercetat problema metabolismului compușilor flavonici. Durata apariției în urină variază, unei indică 2—3 ore, alții cîteva zile. Faptul e explicabil, căci au folosit cai diferenți de administrare și animale diferenți : iepuri, cobai, şobolani, pisici, cini.

În lucrările care privesc metabolizarea flavonoizilor CLARK și colab. apreciază că numai 1% din doza administrată e absorbită, restul e eliminat nemodificat.

STELZIG și RIBEIRO găsesc în cercetările de eliminare a unor flavonoizi că unii se elimină exclusiv prin urină, iar alții numai prin fecale.

Spre deosebire de intervenția florei în scindarea flavonoizilor despre care ne-am ocupat, MARCHELLI semnalează capacitatea de a sintetiza flavonoizii din precursori existenți în mediu, ai ciupercii *Aspergillus candidus*. Adaosul precursorilor de glucoză, metionină, fenil-alanină se face la începutul fermentației. Prezența flavonoidului e evidențiată cu ajutorul spectrului de rezonanță magnetică.

### Geneza tulburărilor în boli circulatorii

O altă categorie de cercetări se preocupă de modificările incipiente funcționale și morfologice care favorizează diferențe îmbolnăviri circulatorii disparate în aparență, varicoze, ateroscleroză, reumatism, fragilitate și permeabilitate capilară crescută.

LASZT atrage atenția asupra necesității ca aceste tulburări să fie depistate în fază inițială pentru a avea un tratament eficace. Acest autor constată în varicoze tulburări în metabolismul glucidic. De asemenea și un consum de trei ori mai redus de oxigen al fragmentelor de venă varicoasă. Producerea de acid lactic e crescută. Analiza constituentei peretelui venos, proteinele, collagenul, hexosamina arată unele modificări. Elastina face excepție.

NIEBES se interesează de situația enzimelor catabolizante a mucopolizaharidelor și anume : glucuronidaza, B. acetiglucozaminidază, fosfataza acidă, arylsulfataza, hyaluronidaza și catepsina.

În vena varicoasă, cu excepția catepsinei, activitatea acestor enzime e crescută. Autorul conchide că alterațiile varicoase au la bază tulburări de metabolism al hidraților de carbon, provocând instabilitatea enzimelor lisozomale și eliberarea fermentilor care antrenează tulburări de metabolism al mucopolizaharidelor și respectiv modificări ultrastructurale ale collagenului și elastinei. Si alți autori se preocupă de studiul modificărilor din țesutul conjunctiv caracteristice varicozei. ZWILLEMBERG și colab. recurg la culturi celulare din explante de venă safenă umană varicoasă și venă bovină din membru inferior precum și din vena jugulară.

Folosind diferite condiții de cultură reușesc să reproducă alterațiiuni asemănătoare celor din vena varicoasă. Constanța aparține unui colagen de aspect spumos pe care l-au denumit „structură asociată collagenului“ (CAS) și care apare în tunica medie a venei bovine în a 14-a zi de cultivare. În mediul de cultură apare N acetyl-glucozaminidaza și acid lactic, activitatea enzimei este mai redusă în mediu hipoxic și anaerob. Autorii susțin că în aceste procese intervin cu rol activ celulele musculare din venă, dovedă că CAS nu apare în culturi ale venei jugulare care e foarte săracă în celule musculare.

Pentru obținerea efectelor semnalate, autorii insistă asupra condițiilor riguroase de pH care trebuie respectate. Adaosul flavonoizilor mediului de cultură inhibă apariția CAS-ului considerat ca mucopolizahrid alterat.

În continuarea cercetărilor asupra condițiilor care determină leziuni asemănătoare variozei, ZWILLENBERG-FRIEDMAN și colab. incubează fragmente de țesut conjunctiv de ligament în extracte de venă umană, de uter bovin, de vezică urinară. Se obțin aceleași formațiuni CAS în anumite condiții de pH, precum și scindarea fibrelor și derularea helixului. Imagini comparative apar în țesut normal și în structuri de aspect caracteristic varicozei. Autorii apreciază ca un efect minor acțiunea flavonoizilor asupra ultrastructurilor cercetate în cazul folosirii preparatelor semisintetice de Venoruton.

În cercetările referitoare la metabolismele din peretele arterial, FILIPOVICI recurge la cultura de segmente de aortă în mediu cu trigliceride și constată o creștere a consumului de oxigen sub influența adaosului de flavonoizi. Nu apare o influență însemnată asupra producției de lactat.

Studiul enzimelor glicolitice din vene varicoase și normale menținute în extracte sarcoplasmice, de safena varicoasă, psoas și mușchi cardiac este efectuat de MATAGNE și HAMOIR.

Utilizând electroforeza în gel de amidon se constată unele diferențe în ceea ce privește proteinele în distribuția lactat-dehidrogenazei care tinde mai mult spre un metabolism aerobic.

Nu se constată însă diferențe în activitatea enzimelor glicolitice. O creștere a activității enzimelor lizosomale e semnalată de MIRKOVIC în experiențele sale de tromboză experimentală pe cîine.

ZEMPLNY atribuie localizarea preferențială a leziunilor ateroscleroase cerebrale unor factori hemodinamici și hemoreologici la care se adaugă și hipoxia locală. Aceasta favorizează eliberarea histaminei și consecutiv creșterea permeabilității și disruptarea celulelor perivasculare mastocitare. Eliberarea histaminei favorizează depunerea particulelor coloidale și lipidelor pe peretele vascular, pe fondul permeabilității modificate. Flavonoizii au proprietatea de a influența acest factor, deci sunt utili și în prevenirea aterosclerozei.

PARROT și GAZAVE și GAZAVE au denumit această fracțiune activatoare, vitamina C<sub>2</sub>. Acest factor vine în competiție cu enzima ortometiltransferaza (COMT) care intervine în prima etapă de metabolizare a adrenalinei (11). Flavonoizii intră în competiție cu procesul metabolic al adrenalinei, îl impiedică temporar și prelungesc astfel durata de acțiune. În acest proces flavonoizii apar ca factori de economisire, de protecție a adrenalinei, acțiune ce o efectuează sinergic cu acidul ascorbic „la rîndul său un artodifenol competitiv enzimei catecol-ortodifenoltransferază. Alte păreri asupra mecanismului de acțiune a flavonoizilor admit că influența asupra adrenalinei are loc indirect, prin stimularea hipofizei și prin acțiunea hormonului corticotrop ACTH asupra suprarenalelor.

Se mai afirmă de asemenea că flavonoizii acționează direct pe peretele capilarilor provocînd vasoconstricția precapilarelor. Închiderea

sfincterelor precapilare s-ar datora unei acțiuni antienzimaticе, anume inhibiție de fosforilare a ADP în ATP, fosforilare absolut necesară relaxării musculare.

Relativ la mecanismul de acțiune al flavonoizilor considerăm util să încheiem expunerea citind interpretarea dată de doi biochimiști competenți în acest domeniu. După cum se exprimă SORU compusii cu funcția vitaminei P funcționează ca un sistem oxidoreductor reversibil în sinergism cu acidul ascorbic — dehidroascorbic.

SZENT GYÖRGYI afirma că în procesul de oxidare ar interveni peroxidaza-ascorbică, stabilind corelația posibilă de acțiune între vitamina P și vitamina C.

În anumite stări carentiale, fiecare din aceste produse separat nu este total eficace ; ele au acțiune sinergică numai administrate concomitent.

Prin intervenția vitaminei P la nivelul sistemului oxidoreductor reversibil adrenalină-adrenocrom s-ar reduce viteza de oxidare și distrugere a adrenalinei care are rol în rezistența capilară.

Vitamina P ca sistem oxidoreductor ar avea rol în mecanismul transferului de hidrogen. Prin această acțiune vitaminele P intervin în diferite procese metabolice respiratorii celulare, metabolismul glucidelor, proteic, ionic, metabolismul apei.

BESANGER-BEAUQUESNE este de părere că asupra funcțiunilor grupului flavonoizilor se pot face mai curind ipoteze. E de părere însă că pentru plante aceștia au un rol în fenomenele de oxidoreducție. SZENT GYÖRGYI a admis că intervenția flavonoizilor în respirația celulară a vegetalelor, prevăzute cu peroxidaze, sunt transporturi de hidrogen. Soarta lor este legată intim de acidul ascorbic.

Flavonoizii constituie un intermediar în oxidarea acidului ascorbic. Oxidazele actionează direct, peroxidazele descompun apa oxigenată produsă în oxidările directe, transformă flavonele în quinone care, la rîndul lor oxidează acidul ascorbic pentru a relua forma fenolică și ciclul oxidoreductor reîncepe.

Posibilitatea de a cataliza este atribuită naturii fenolice a flavonoizilor. Intervenția acestora în accelerarea sistemelor fiziologice în care intervine acidul ascorbic ar sugera că flavonoizii au rol de coenzime. După părerea noastră, un aspect care trebuie luat în considerare este proprietatea chelatantă a flavonoizilor ; intervin competitiv în diferite procese enzimaticе și pot astfel deriva o serie de metabolisme importante descrise de GAZAVE și colab. în lucrările amintite.

### C. TERAPIA CU COMPONENTA FLAVONOIDICĂ A PROPOLISULUI ȘI TESTAREA REZULTATELOR

În această parte nu ne referim la rezultatele terapeutice ale propolisului.

O documentare bogată se află în publicația apărută în 1975 „Propolisul“ Ed. APIMONDIA și în referatele congreselor și revistelor de specialitate.

Ne ocupăm de : 1) rezultatele obținute în terapie cu componenta flavonoidică și 2) de metodele de testare a efectului terapeutic.

O inițiativă utilă a unor industrii farmaceutice a fost aceea de a pune la dispoziție produsele flavonoidice unor echipe de cercetători capabili să aprofundeze obiectiv, sub cele mai variate aspecte, acțiunea asupra manifestărilor patologice tratate ; rezultatele au fost prezentate în simpozioane și discutate.

Unele controverse au existat referitor la integrarea flavonoizilor în metabolismul general. Acestea au fost elucidate de biochimiști, care au pus în evidență metaboliți ai flavonoizilor în urină, bilă sau fecale ; GILES și GUMMA au pus în evidență în serum unor voluntari prezența unor flavonoizi administrați sub formă de tablete. Au folosit tehnica THIES și FISCHER.

De asemenea, LAPARRA și colab. (28) utilizând autoradiografia semnalează la șoareci, etapele de integrare în organe a unui flavonoid marcat de izotopi.

DEREVICI și colab. descriu prin examen histologic etapele succesive ale integrării propolisului în metabolism, pînă la formarea vacuolelor enzimaticе.

Pentru aprecierea obiectivă a proprietăților flavonoizilor, histologii folosesc unele metode experimentale prin care provoacă pe animale tulburări circulatorii pe care le tratează cu diferiți derivați flavonoidici de care ne vom ocupa ca grup chimic general în această expunere.

PRATESI și colab. crează ischemie regională prin ligatura carotidei. După un anumit interval prelevă cortex cerebral a cărui ultrastruktură e cercetată. Martorului (iepure) i se prelevă de asemenea cortex cerebral. La interval de 12 ore de la ligatura carotidelor constată lumenul capilar îngustat, citoplasma îngroșată. În stromă — numeroase fibrile de colagen. La iepurele tratat în prealabil timp de 15 zile cu flavonoizi și sacrificat la 12 ore de la ligatura ambelor carotide se constată membrana bazală de grosime cvasi normală, mai puțin opacă la electroni decât în ischemie pură.

Iepurele tratat pe cale parenterală în doza de 100 mg/zi prezintă un capilar normal ; membrana bazală înglobează în dedublare frecvente pericite. Limitele celulare și organitele endoplasmaticе — de aspect normal.

CETTA și colab. tratează cu unii flavonoizi leziuni asemănătoare celor din varice provocate cu aminocetonitrili. Constată o influență bună asupra colagenului precum și asupra endoteliului vaselor mici. Se reprezintă media variațiunilor colagenului solubil (în NaClO, 45 M) în aorta iepurelui latirizat și protejat prin flavonoizi. Se indică valoarea colagenului solubil, crescut la animale latirizate cu acetonitrili. Se constată scăderea colagenului solubil la animale tratate concomitent cu flavonoizi.

HAMMERSEN recurge, pentru realizarea pe șobolani a unui edem, la dextran, spre a studia efectul flavonoizilor. Aceștia sunt administrati înaintea dextranului fie cu 7 zile înainte pe cale orală sau cu o

oră înainte pe cale intravenoasă. Sacrificarea e precedată scurt timp înainte de injectarea de cărbune pentru a marca leziunile. Animalele martore nu primesc dextran. Se fac prelevări la o oră și la patru ore după dextran.

Pretratarea cu flavonoizi determină un număr mai redus de excreșențe și o reducere a grosimii membranei bazale.

Totuși, aspectul țesutului conjunctiv nu revine total la normal.

Pentru studiul influenței flavonoizilor asupra manifestărilor carentiale au fost imaginate metode diferite.

Cercetarea fragilității capilare și a permeabilității crescute constituie obiectivul atenției clinicienilor.

Fragilitatea capilarelor poate fi pusă în evidență realizând o presiune pozitivă care suprime temporar circulația venoasă. Se recurge preferabil la brățara aparatului de tensiune. Se numără peteșile (mici hemoragii subcutane), care apar pe o suprafață anumită, și se stabilește timpul de apariție. Se poate recurge la o presiune negativă cu ajutorul unei mici ventuze de cauciuc. În comerț există angiostermometrul PAR-ROT.

WILD și FASEL recurg la aceste tehnici spre a pune în evidență insuficiențe venoase cronice cu ciroză hepatică. Determină rezistența mucoasei rectale și timpul necesar apariției peteșilor. Compara rezultatele obținute înainte și după tratament cu flavonizi (preparat Zyma denumit Venoruton).

Se observă o alungire a timpului de apariție a peteșilor după o săptămână de tratament.

PARROT și CANU constată creșterea rezistenței capilarelor după numărul de peteșii apărute după tratare cu flavonoizi diferiți.

Permeabilitatea capilarelor poate fi stabilită prin testul Landis care constă în crearea stazei venoase cu brățara aparatului de presiune la unul din brațe și apreciază comparativ rezultatele obținute în singele fiecărui braț. Se determină cantitatea de lichid: 1) extravazat în afara capilarelor, 2) hematocritul, 3) cantitatea de proteine din ser.

Brățara aplicată e menținută 30 minute la un singur braț, numai. Această tehnică a fost utilizată de WISMER pe loturi de bolnavi înainte și după tratament de 4 sau 8 zile cu flavonoizi. Se constată o diminuare a volumului filtratului și a proteinelor extravazate.

ACTIONEA flavonoizilor asupra permeabilității capilarelor mai poate fi apreciată cu testul difuzării unui colorant (de regulă albastru tripan Evans) într-o regiune iritată în prealabil cu cloroform; tehnica e folosită de LOISLLEUR și colab. aplicând două injecții de flavonoid (Flacitran) la interval de 24 ore și după 6 ore de repaus se constată o întirzire a difuzării sub influența flavonoidului preparat din citrine cu adăos de ioni de magneziu.

PARIS și MOURY au adus modificări acestei tehnici. Pentru a dispune de mai multă obiectivitate se folosesc, pentru a determina apariția și intensitatea colorației tegumentului, de o celulă fotoelectrică la care adaptează un galvanometru pentru înscrierea din timp a variației difuzării colorantului. Obțin efecte favorabile cu flavonoizi.

GABOR relevă rolul antiinflamator al flavonoizilor și studiază acțiunea acestora asupra permeabilității capilarelor prin procedeul difuzării colorantului Evans (injectat intravenos), în regiunea iritată.

Pielea colorată se extrage după decapitarea şobolanilor, se curăță de grăsime, se extrage colorantul cu piridină și se apreciază fotometric cantitatea de colorant pe o suprafață cunoscută.

Se constată reducerea permeabilității prin difuzarea întărziată în loturile tratate cu flavonoizi.

O altă modalitate de a studia permeabilitatea capilarelor a fost propusă de CALNAN. În scopul aprecierii gradului de filtrare spre lichidul intersticial metoda introduce subcutan o capsulă fenestrată căreia î se adaptează un sistem de prelevat lichid intersticial la diferite intervale. Valorile unor constante pot fi determinate în lichidul prelevat apreciind astfel permeabilitatea capilarelor.

Studiul fragilității și permeabilității capilare în afecțiunile oculare dispune de un mijloc prețios reprezentat prin utilizarea fluorescentografiei. Metoda permite fotografarea fluorescenței apărută pe arteriolele retiniene.

Injectarea soluției de fluorescență necesită o serie de pregătiri destul de complicate după cum reiese din lucrarea lui TSCHOP. Se execută fotografii la diferite intervale. Se pot folosi filme în culori pentru fundul de ochi. Compararea fotografiilor permite evaluarea evoluției retinopatiei diabetice. În urma administrării flavonoizilor și paralel a aceluia lot care primește placebo. Criteriul de apreciere este prezența microanevrismelor și extravazatelor fluorescenței.

După fotografii se fac scheme pe hîrtie de calc ale arterelor, venelor, ale extravazatelor fluorseinei și ale microanevrismelor. Schemele se confruntă ulterior, impreună.

În fiecare perioadă de tratament bolnavii primesc 400 mg de HR\* de trei ori în 24 ore timp de două luni; placebo se administreză de asemenea două luni, apoi se repetă ciclul cu HR.

Autorii conchid că acest procedeu este obiectiv și permite stabilirea efectului tratamentului. Nu apar hemoragii noi, dar cele existente se mențin. Există și diminuarea permeabilității la fluorescență. Efectul se menține însă numai în cursul tratamentului.

Pentru aprecierea valorii unui tratament al tulburărilor de circulație venoasă, CAUWENBERGE și colab. folosesc un derivat de rutozid Venoruton — Zyma. Între alte metode de a provoca inflamație recurg la implantarea subcutană a unui tampon de vată care determină formarea unui abces. Un lot de animale este tratat cu flavonoizi în doze variate între 10 și 200 mg la 100 g.

Alți cercetători ca LUND și colab. în experiențe pe şobolan creează un edem prin compresiune la baza cozii. Apresiază intensitatea edemului după volumul apei deplasate în cilindrul gradat anexat. LUND și colab. apreciază astfel valoarea neutralizantă a unor flavonoizi folosind loturi de animale tratate și netratate cu HR. Autorii recurg

---

\* Gerovital HR.

pentru obținerea edemului și la injecții de adrenalină, ergotamină la baza cozii. După 12 ore începe administrarea de HR care se continuă timp de 5 zile la fiecare 12 ore.

THULESIUS și GJÖRES cercetează vîscozitatea săngelui pe bolnavi cu insuficiență venoasă cronică. Se determină vîscozitatea înainte și după tratament în săngule cubital și în cel prelevat din membrele inferioare.

Nu reies diferențe importante între loturile tratate și martore, ceea ce determină pe autori să excludă intervenția vîscozității în tulburările circulatorii venoase, contrar aprecierilor deduse de LOISLLEUR și colab. din experiențele lor pe animale, bazate pe difuzarea coloranților.

Importanța instalării unei circulații colaterale după accidente ischemice, rezultate din suspendarea circulației coronariene și în arterele membrelor inferioare, a fost studiată de BRKAČ și LAZT. Autorii imaginează un aparat care permite a înscrive grafic mecanograma. Aceasta reprezintă răspunsul nervului corespunzător mușchiului în care s-a instalat circulația colaterală. În cazul experiențelor pe cord se utilizează electrocardiograma. Tratarea cu Venoruton a dat rezultate semnificative asupra instalării circulației colaterale.

O altă tehnică de studiu a acțiunii flavonoizilor este imaginată de SCHLEBUSCH și KERN. Aceștia pleacă de la asemănarea structurii chimice a unor flavonoizi și a polifenolilor folosiți în tăbăcărie (taninuri), ceea ce ar sugera că și flavonoizii ar putea acționa ca stabilizatori ai colagenului. Se știe că fibrele de colagen se contrag, reducindu-se și producind degajare de temperatură și energie care poate fi măsurată cu ajutorul unui aparat. După părere autorilor flavonoizii ar acționa ca un agent de tăbăcărie. Acțiunea flavonoizilor este proporțională cu concentrația.

Terapia cu flavonoizi a fost aplicată la bolnavi cu manifestări provocate de carență acestora: în scorbut, fragilitate și permeabilitate crescută, tulburări circulatorii în membrele inferioare, varice, în ateroscleroză, edeme, arsuri.

Pentru precizarea deficiențelor vasculare se întrebuiștează una sau mai multe din metodele enunțate anterior. În genere se lucrează cu martori cărora li se administrează placebo, un produs inert în același format ca cel cercetat. Industria farmaceutică a pus la dispoziția cercetătorilor preparatele ce trebuiau controlate obiectiv, de aceea adeseori experimentatorul nu știa nici el cu ce produs lucrează. Au fost utilizate produse semisintetice, derivați ai rutozidului extras din floarea de salcâm galben, alte preparate proveneau din citrice, uneori în adăos cu ioni metalici. Se mai utilizau extracte din fructe de pădure (afine, coacăze, etc.) sau din castane etc.

Activitatea clinicienilor bazată și pe teste de laborator obiective asigură concluzii prețioase asupra valabilității terapeutice a unui produs cercetat.

Majoritatea cercetătorilor insistă asupra lipsei de toxicitate a flavonoizilor, toleranța menținându-se față de doze mari și îndelung administrate.

Această proprietate a încurajat probabil numeroase inițiative de a studia terapia cu flavonoizi. Vom semnala numai cîteva nume din bogata documentare existentă. DEMURE a lucrat cu Difrarel extras din afine, CLEMENT cu produse citroflavonoidice, PREROVSKI, KAPPERT, RAZGOVA, CAUWENBERGE, McEVANS, FILIPPI, LECOMBE și CAUWENBERGE folosesc produse semisintetice ale rutozidului denumit Venoruton.

Acești din urmă autori au semnalat manifestări amino-liberatoare a unor derivați ai rutozidului notat Z 4000, însă numai pe șobolani. Se constată o scădere bruscă a tensiunii arteriale urmată de tahifilaxie (puls precipitat).

Autorii precizează că aceste fenomene nu apar la om, la care se utilizează alți derivați de rutozid.

LAGRUE și colab. cercetează tulburările circulatorii prezente în ateroscleroză, în hipertensiune arterială pe care le tratează cu ameliorări vădite în 22 din cazuri. Tratamentul pe cale bucală a 100 mg × 3 în 24 ore de trei săptămâni se repetă după o pauză de alte trei săptămâni. Au folosit Esculoside Ld (25) utilizat sub denumirea Folescutol și în altă serie de experiențe ROSE obține ameliorarea simptomatologiei subiective din varicoze și simptome postflebitice; conchide asupra utilității flavonoizilor în terapeutica tulburărilor circulatorii ale membrelor inferioare.

LECOQ recomandă flavonoizii în purpură și alte boli hemoragice (scorbut) în care apar inițial echimoze frecvente, în nefrite hematurice, scleroză și hipertensiune arterială, tulburări mensruale, dezechilibru hepatic, GÖTZ menționează scăderea colesterolului și rezultate mulțumitoare cu Concentrin (preparat din castane) în varicoze, ulcere varicoase, tromboflebite. PARIS și MOURY, controlează eficacitatea administrării flavonoidice în tulburări de permeabilitate, cu testul difuzării colorantului albastru Evans cu electroreflectometru conexat cu un galvanometru, găsesc că permeabilitatea crescută e ameliorată sub influența flavonoizilor. Fapt confirmat și de ARTUSON în cazuri de arsuri și de DEREVICI și colab. care utilizează în arsuri experimentale o emulsie hidroalcoolică din propolis în care se află flavonoizi.

Din documentarea privitoare la utilizarea flavonoizilor în oculistică reiese posibilitatea de a stăvili mersul afecțiunilor în care predomină retinopatii.

WEGMAN studiază rolul enzimelor în procesele de adaptare la expunere la lumină intensă și utilizând retinograme stabilește efectul favorabil al flavonoizilor.

Cercetările lui ALFIERI privesc adaptarea rapidă la întuneric, constată coborîrea pragului luminos absolut după tratarea cu flavonoizi. Autorii explică mecanismul prin conversiunea radiațiilor ultraviolete ineficace, în radiații vizibile de lungimi de undă mai mari. De acord cu rezultatatele lui ALFIERI sunt MASQUELIER și colab. și PERDRIEL care studiază efectul citroflavonoizilor în adaptarea la ebluire. NEUMAN și THOMAS și BORISAIN, ROMANI folosesc tratamentul cu flavonoizi în angiopatii conjunctivale din cursul predia-

betului sau din diabet. Preparatul denumit Difrarel conține extract de afine. PETERSON și HEALTH (42) induc retinopatii prin tratarea șobolanilor cu imunodipropionitrile, pe care le inhibă cu flavonoizi.

BAIDAN și OITĂ (3) utilizează în afecțiuni oculare soluții sau unguente obținute în solvenți pe bază de amine organice ale propolisului. Se obțin rezultate bune în arsuri corneoconjunctivale, blefaroconjunctivite.

Flavonoizii au fost utilizati și în dermatologie cu rezultate bune sub formă pulverizată de către BOLLIGER (5); au fost alese cazuri cu prurit, eriteme, ulcere varicoase semi-inchise sau care lasă indurații. LECOQ a propus folosirea în purpură, LECLERCK în psoriasis (33).

De asemenea folosirea flavonoizilor în localizarea tumorilor a dat rezultate bune lui BALANGER și DAX (4) iar RUDALI și JULIARD (48) constată inhibarea difuziunii tumorale prin flavonoizi la șoareci care fac tumori mamare cind sunt ținuți în sarcină continuă. RUDALI, DEUCHAUME și COUSTOU (47) obțin acest rezultat cu chelate magneziene de flavonizi. După părerea lui BÖHM (6) chelatarea este un mecanism de bază a acțiunii flavonoizilor. CLEMESTON încă insistă asupra sinergismului cu acțiunea acidului ascorbic, flavonoizii fiind considerați factori de economisire a acestui acid cu care intervin în fenomene de oxido-reducere.

## INSUȘIRILE FITOINHIBITOARE ALE UNOR SUBSTANȚE PRODUSE ÎN COLONIA DE ALBINE (*APIS MELLIFICA L.*)

M. GONNET  
FRANTA

### Introducere

Încă din anul 1960 am arătat că anumite fractiuni extrase din produsele stupului inhibau germinația semințelor unor plante (GONNET și LAVIE, 1960). Se vorbea în acea perioadă despre o nouă orientare în studiul acestor substanțe. Se cunoșteau deja însușirile antibacteriene ale unor produse ale albinei, dar se cunoșteau prea puține lucruri despre acțiunea lor fitoinhibitoare.

Aceste însușiri nu constituie totuși un fenomen izolat. Există foarte numeroase exemple care arată că anumite extracte din substanțe de origine vegetală sau animală provoacă fenomene de fitoinhibabile. Au fost decelați, de pildă, inhibitorii germinației sau ai creșterii diferitelor organe de plante, cum sunt: rădăcini de *Helianthemum*, *A. phyllanthes*, *Papaver*, *Thymus*, *Rosmarinus* etc. (I. BECKER, GUYET 1951; DELENIL (1951); frunze tulpini și muguri de *Xanthium*, *Centaurea*, *Allium*, *Lycopis*, *Pelea*, *Salix* etc. (KONIS 1947; FLETCHER, RENNEY 1963; LAN-

KANZOV 1965 ; GARESTIER et al. 1966 ; KEFELI 1966) fructele și semințele de *Lycopersicum*, *Vicia*, *Oryzo* etc. (KONIS 1940 ; PEYRONEL VARA 1966). Pe de altă parte, anumite extracte ale unor secreții animale prezintă de asemenea activitate inhibitoare : sterolii, terpenoidele, hormonii și diastazele s-au dovedit active față de plante (LUSTIG și WACHTEL 1939 ; BOITEAU și RATSIMAMANGA 1958 ; CIZKOVA și URLYCHOV 1964 ; NITSCH și NITSCH 1965 ; MILCU 1966 ; RATSIMAMANGA 1966 ; MAC LAREN și BRADFUTE 1966), saliva umană conține un inhibitor al germinației plantelor (YARDENI 1948). În sfîrșit, cîțiva autori au studiat efectul inhibitor al antibioticelor asupra germinării și creșterii plantelor (BARTON, MACNAB 1954 ; DUQUESNOIS 1955 ; BRIAN și colab., 1965).

La insecte, anumite secreții au o importantă putere fitoinhibitoare ; cităm după PAVAN (1958) acțiunea inhibitoare exercitată asupra speciilor *Lupinus albus* și *Allium cepa* de iridomirmecina extrasă din *Iridomyrmex humilis*, cantaridina secretată de *Lytha vesicatoria*, pederina produsă de *Paederus fucipes*. După LEMAY (1947) veninul de albină controlează germinarea semințelor. PAVAN (1958) a izolat dintr-o secreție a albinei — lăptișorul de matcă — o substanță cristalizabilă, puțernic inhibitoare a creșterii la *Lupinus albus*. Primele noastre lucrări (GONNET, LAVIE (1960) au fost realizate folosind boabele de orez (*Oryza sativa*) cultivat pe vată hidrofilă ca substrat. În apă cu care se irigau semințele au fost introduse extracte apoase de produse ale albinei. S-a lucrat cu extract de propolis, de polen, de miere, de ceară, de lăptișor de matcă și de albine întregi. Propolisul și mierea au provocat o inhibiție totală a germinării orezului. Alte extracte testate au determinat o încetinire a creșterii plantelor în comparație cu martorul irigat cu apă. DEREVICI și colaboratorii (1964) au remarcat o inhibare a germinării la *Cannabis sativa*, în compoziția mediilor de cultură utilizate întrînd extracte alcoolice de propolis. Acești autori au insistat mai ales asupra puterii inhibitoare, mai mult sau mai puțin importante, a diverselor, „calități“ de propolis care au fost utilizate. Într-o lucrare mai recentă (GONNET 1966) a fost studiată în mod special acțiunea propolisului asupra semințelor de lăptucă *Lactuca sativa*. Inhibiția se manifestă, în funcție de concentrațiile studiate, printr-o încetinire sau chiar oprire a creșterii plantelor. Această ultimă lucrare a arătat că este vorba de o inhibiție a creșterii plantelor și nu de o inhibiție a germinației în sensul strict, aşa cum au considerat autorii anteriori.

Ca urmare a acestor încercări preliminare am studiat mai amănunțit fenomenele de fitoinhibiție provocate de substanțele prezente în stup.

## **Material și metode**

A. Natura și extracția cîtorva substanțe existente în stup

Extractele pe care le-am testat au fost preparate în felul următor :

— *Extract apos de propolis* ( $P_1$ ), 80 g propolis sunt extrase cu apă distilată cloicotită. Extractul este recuperat, concentrat pe baie de apă și filtrat ; 1 cm<sup>3</sup> din acest extract conține 95 mg substanță uscată ;

— *Extract alcoolic de propolis* ( $P_2$ ), 80 g propolis sunt extrase cu alcool (1 oră, cu reflux). Extractul este filtrat prima dată la cald, apoi pe dispozitivul Büchner, a doua oară la rece după precipitarea cerurilor. Alcoolul este evaporat. Reziduul este reluat în apă distilată, răcit la 0°C, centrifugat și filtrat. 1 cm<sup>3</sup> de filtrat obținut conține 50 mg substanță uscată.

— *Extract alcoolic de polen din ghemotoc colectat de albine* ( $P_8$ ) 20 g polen din ghemotoacele colectate de la o colonie de albine sunt mojarate și extrase cu alcool la rece. După filtrare alcoolul este evaporat. Reziduul, reluat cu apă, este răcit la 0°C, centrifugat, apoi filtrat. 1 cm<sup>3</sup> soluție activă conține 118 mg substanță uscată.

— *Extract alcoolic de păstură* ( $P^3$ ). 20 g păstură, din fagurii din același stup (stupul nr. 225), sunt extrase și tratate în modul descris mai sus. 1 cm<sup>3</sup> de extract conține 148 mg substanță uscată.

— *Extract de miere* ( $C_S$ ). Este vorba de fracțiunea acidă saponificabilă a unui extract de miere esterificat. Modul de obținere a acestei fracțiuni va face obiectul unei descrieri amănunțite cu altă ocazie. 1 cm<sup>3</sup> de soluție apoașă conține 3,3 mg substanță uscată.

— *Extract acetono-alcoolic de ceară* (C) 10 g de ceară veche sunt dizolvate în acetona, la cald. Acetona este parțial evaporată extrasă și reluată cu alcool, decantată și filtrată. Alcoolul este evaporat ; reziduul este reluat cu apă și lăsat să se decanteze în frigider (0°C) timp de 24 ore. Se centrifughează și se filtrează. 1 cm<sup>3</sup> de filtrat conține 154 mg substanță uscată.

— *Extract alcoolic de albine* (A). 50 g de albine prelevate dintr-un stup sunt puse la macerat în alcool timp de 24 de ore apoi extrase timp de 1 oră în reflux. După o primă filtrare într-un aparat Büchner, alcoolul din filtrat este evaporat iar reziduul reluat cu apă. Extractul depus 24 ore în refrigerație este centrifugat, apoi filtrat din nou. 1 cm<sup>3</sup> din această soluție conține 270 mg substanță uscată.

A fost testat efectul fitoinhibitor al tuturor acestor extracte asupra creșterii la *Lactuca sativa*. Ca urmare, am menținut materialul și metodele de control care ne-au satisfăcut în primele noastre încercări (GON-NET 1966).

## B. Probe biologice pentru specia *Lactuca sativa*

Această metodă, deja folosită în lucrarea noastră precedentă trebuie descrisă mai detaliat, ținând seama de faptul că a primit unele îmbunătățiri.

Noi utilizăm ca mediu de cultură geloză 20% în apă distilată, la care se adaugă în diferite concentrații fie soluția de studiat, fie apă ca martor. Aceste amestecuri sunt imediat trecute în plăci Petri (cu diametrul de 10 cm). Concentrația extractului utilizat pe substrat este exprimată în mg substanță uscată la 1 cm<sup>3</sup> de mediu. Studierea unei concentrații a acestui extract este realizată cu ajutorul a 3 cutii, în fiecare placă fiind semănate 100 semințe. Această însămîntare se efectuează pe cît posibil omogen pentru a facilita prelevările ulterioare. Sămînta utilizată este lăptuca de Batavia (Blonde de Paris). Creșterea are loc în etuvă și la o temperatură de 25°C; umiditatea relativă a încăperii este de 80% 16 ore după însămîntare plantele sunt expuse la lumină timp de 30 minute. Această expunere este repetată de 5 ori pe timpul întregii durate a experienței (fie după 16, 24, 40, 48 și 60 ore). Sursa luminoasă este constituită de o rampă alcătuită din 2 lămpi fluorescente de 40 wați fiecare (Philips blanc brillant). Iluminarea primită la nivelul fiecărei plăci este de 1500 lucși.

Citirile sunt efectuate la 70 de ore după însămîntare. Se prelevă din fiecare placă 20 de plantule, procedindu-se în felul următor: în scopul de a evita o alegere preferențială din ansamblul de semințe, se suprapune pe placă un disc de carton cu diametrul de 10 cm. Pe acest disc sunt desenate 5 cercuri de 2 cm în diametru situate la distanță egală între ele (un cerc central și o suită periferică de 4 cercuri). Prelevările de plantule se efectuează prin transparentă în interiorul fiecăruia din aceste cercuri. Rezultatele sunt exprimate în lungimea hipocolitelor și a rădăcinuțelor (măsurată sub o lupă binoculară) potrivit raporturilor:

(Lung. hipocot.) I<sup>n</sup>

(Lung. hipocot.) T

(Lung. răd.) I<sup>n</sup>

(Lung. răd.) T

în care I<sup>n</sup> reprezintă diluția în substrat a unui extract inhibitor I, iar T — martorul.

### Rezultatele obținute

Toate extractele obținute au provocat (la concentrații diferite) o oprire sau o încreștere a creșterii plantelor. Această inhibiție este cea mai puternică la nivelul rădăcinii. Schema ilustrează activitatea comparată a tuturor acestor substanțe.

Din aspectul curbelor care exprimă inactivarea creșterii radiculare a plantelor se constată că extractul de miere (C8) posedă o putere inhibitoare foarte ridicată (inhibiție totală cu 0,030 mg substanță uscată la 1 cm<sup>3</sup> mediu de cultură); este urmat de extractul alcoolic de propolis (P2) (inhibiție totală la 1,5–3 mg substanță uscată/cm<sup>3</sup>). Alte substanțe au o acțiune mai slabă (concentrații cuprinse între 1 și 5 mg substanță uscată la cm<sup>3</sup> de mediu de cultură în cazul inhibițiilor parțiale), extractele de polen (și în special cel de polen din ghemotoace) sănt foarte puțin active.

### Discuție și concluzii

Toate substanțele extrase din stup posedă, în grade diferite, facultatea de a inhiba sau încetini creșterea plantelor de lăptucă. Menționăm în mod special interesul pe care-l prezintă o fracțiune acidă saponificată extrasă din miere care inhibă dezvoltarea plantulelor în doze foarte slabe. Extractele de propolis prezintă în egală măsură o activitate remarcabilă. Fracțiunea inhibitoare prezentă în propolis este mai ușor de extras cu alcool decât cu apă. Extractele de albine și de ceară au o acțiune destul de slabă. În sfîrșit, polenul stocat în faguri de către albine relevă o activitate redusă, polenul proaspăt din ghemotoace fiind încă și mai puțin activ.

Constatăm, aşadar, că puterea fitoinhibitoare a fracțiunii extrase din corpul albinei este slabă în comparație cu activitatea produselor recoltate de albină. În mod firesc acestea ne-au condus la presupunerea că substanțele inhibitoare ale creșterii vegetale, prezente în miere și propolis, sănt cel puțin în mare parte de origine vegetală. De altfel, lucrări complementare sănt în curs, iar rezultatele obținute ne vor permite în curind să tragem concluzii asupra acestui subiect. Dar putem afirma că o parte din substanțele inhibitoare provin din stup și sănt de origine animală. Exemplul polenului este o confirmare evidentă. Am arătat că polenul stocat deja amestecat cu numeroase secreții salivare și tasat în faguri de către albine este mai activ decât polenul din ghemotoace care a suferit numai un inceput de transformare. Ori, trebuie să menționăm în acest caz că recoltarea acestor categorii de polenuri a fost efectuată în același stup și în aceeași epocă. Cele două tipuri de mostre prelevate erau deci calitativ comparabile. Pe de altă parte MAURIZIO (1960) a constatat că anumite secreții salivare ale albinei, incorporate în polen proaspăt (polen de *Papaver betula*, recoltat manual), împiedică germinația și creșterea tuburilor polinice. Extractele alcoolice de albine întregi au dat același rezultat. Așadar, dubla origine și multitudinea substanțelor cu caracter fitoinhibitor pare evidentă la produsele coloniei de albine. Acest fenomen nu este de loc surprinzător, întrucât după cum am văzut, animalele ca și plantele, pot acumula în anumite țesuturi substanțe care acționează asupra creșterii plantelor.

In sfîrșit, acest studiu completează cunoștințele noastre asupra numeroaselor însușiri biologice ale produselor stupului și constituie în egală măsură o urmare logică a lucrărilor efectuate de LAVIE (1960), consacrate substanțelor antibiotice extrase din produsele albinelor.

### B I B L I O G R A F I E

- BARTON, L. V., MAC NAB J. 1964 — Effect of antibiotics on plant growth. *Contrib. Boyce Thomson Inst. USA*, 17, 419—434.
- BECKER Y., GUYT, L. 1951 — Sur les toxines racinaires de sols incultes. *C. R. Acad. Sci., Fr.*, 232, 105—107.
- BOITEAU P., RATSIMAMANGA, A. R., 1958 — Effet de quelques substances triterpeniques et stéroïques sur la germination des graines et la croissance végétale. *Proc. 15th Internation. Hortic. Cong. Nice*
- BONDE, E. K. 1953 — Growth inhibitors and auxin in leaves of cocklebur. *Phystol. Plant., Danem.*, 6, 234—239
- BRIAN, P., W. et al., 1965 — An inhibitor of plant growth, produced by *Aspergillus wentii* Wehmer, *Nature*, 207, (5000), 998—999.
- CIZKOVA, J., ULRYCHOVA M., RUZICKA V., 1964 — Influence of serum of children and adolescent on the growth of plants *Nature*, 204 (4962), 1010.
- DELEVIL, G., 1951 — Origines des substances toxiques du sol des associations sans thérophytes du *Rosmarino ericon*. *C. R. Acad. Sci., Fr.*, 232, 2038.
- DUQUESNOIS, P., 1965 — Les antibiotiques des plantes supérieures *Bull. Soc. bot., Fr.*, 102 (7—8).
- FLETCHER, R. A., RENNEY, A. J. 1963 — A growth inhibitor found in *Centaurea* ssp. *Canad. J. Plant. sci.* 43, 4.
- GARESTIER, R., RIDEAU, M., CHENIEUX, J.—C. 1966 — Présence de facteurs de croissance et facteurs d'inhibition dans les extraits foliaires de deux rutacées. *C. R. Acad. Sci. Fr.*, 262, 259—262.
- GONNET, M., LAVIE, P. 1970 — Action antigerminative des produits de la ruche d'abeilles sur les graines et les tubercules. *C. R. Acad. Sci., Fr.*, 250, 612—614.
- GONNET, M., 1966 — Action inhibitrice de la propolis récoltée par l'abeille (*Apis mellifica*) sur la germination et la croissance des jeunes plantules chez la laitue (*Lactuca sativa*). *C. R. Acad. Sci. Fr.*, 262, 2281—2284.
- KEFELI, V. I. 1965 — Localisation des inhibiteurs phénoliques naturels dans les foliaires du saule. *Dokl. Akad. Nauk SSR* 179 (2), 472—475.
- KONIS, E. 1940 — On the action of germination inhibiting substances in the tomato fruit. *Palest. J. Bot.*, 2 (1).
- KONIS, E. 1947 — The inhibiting action of leaf saps on germination and growth. *Palest. J. Bot.*, 4 (2).
- LANGE, E. L., KANZOW, M. 1965 — Wachstumshemmung ob hoherem Pflanzen durch abetotete Blätter und Zwiebeln von *Allium urrinum*. *Flora, Dtsch.*, 156 (1), 94—101.
- LAVIE, P. 1960 — Les substances antibactériennes dans la colonie d'abeilles (*Apis mellifica* L.) These Fac. Sci. Paris INRA 1—190.
- LEMAY, P. 1947 — Sur la sécrétion possible d'antibiotiques par certains insectes. *Rev. Pathol. Kyg. Geb.* 373, 589—590.

# STUDIUL COMPARATIV AL SENSIBILITĂȚII STAFILOCOCILOR LA PROPOLIS ȘI LA ANTIBIOTICE

S. SCHELLER  
J. TUSTANOWSKI  
Z. PARADOWSKI  
POLONIA

În urma cercetărilor recente efectuate în laboratorul nostru, am reușit să stabilim spectrul de sensibilitate al bacteriilor față de o soluție alcoolică de propolis confirmând astfel eficiența acestei soluții în tratamentul dermatitelor purulente și al unor maladii ginecologice.

Acțiunea antibacteriană a mostrelor de propolis provenite din surse diferite s-a dovedit a fi diferențiată. Metoda cu rondele, utilizată de noi pentru examinarea acțiunii propolisului, se bazează pe inhibarea creșterii unei sușe standard (*Staphylococcus pyogenes* — Oxford 209 P) cu o anumită concentrație de propolis. Rezultatele acestor experiențe și detaliile metodei clinice utilizate au fost deja publicate.

În cursul investigației am comparat sensibilitatea stafilococilor izolați din materiale patogene cu cea a sușelor de colecție. Al doilea obiectiv urmărit în cercetările întreprinse a fost demonstrarea eventualei corelații între sensibilitatea la propolis și la antibiotice a stafilococilor izolați din materiale patogene.

## Materialul

Am studiat 56 sușe de stafilococi izolați din materiale patologice. Acțiunea antibacteriană a propolisului, examinată prin metoda inhibării dezvoltării sușelor standard a fost determinată pentru 3 mg/ml. Sensibilitatea stafilococilor față de antibiotice a fost determinată prin metoda curentă cu rondele. Antibiotograma a cuprins următoarele antibiotice : penicilină, ampicilină, meticilină, streptomycină, cloramfenicol, teramicină, eritromicină, miacină, sulfatiazol.

## Rezultate

Pentru un număr redus de stafilococi izolați din materiale patogene s-a constatat o sensibilitate la propolis comparabilă cu cea a sușelor standard. Din totalul de 56 specii studiate, numai 5, aproximativ 9% au fost inhibate de propolis în concentrație de 3—9 mg/ml, 23 sușe (41%) au fost inhibate de o concentrație de 12—15 mg/ml — definită ca sensibilitate redusă față de propolis și, în sfîrșit 28 de specii (50%) au fost inhibate de o concentrație de 18—21 mg/ml, ceea ce am definit ca rezistență mare față de propolis. Nu am reușit să obținem un răspuns clar în ceea ce privește corelația dintre sensibilitatea examinată a stafilococilor la propolis și la antibiotice.

Toate speciile cu sensibilitatea certă față de propolis au manifestat o mare rezistență la antibioticele testate. Între sușele care au manifes-

tat o sensibilitate redusă la propolis s-au înregistrat diferite grade de sensibilitate la antibiotice întocmai ca și în rîndul sușelor rezistente. Pentru ultimele două grupe, prin definirea zonei medii de inhibiție s-a evidențiat o reducere generală a sensibilității la antibiotice. Rezultatele sunt cuprinse în tabelele 1, 2, 3.

*Tabelul 1*

**Sensibilitatea la antibiotice a stafilococilor sensibili la propolis**

Sensibilitatea la propolis	Sensibilitatea la antibiotice : zona de inhibiție (medie) a culturii de stafilococi, în mm	
	penicilină	13,4
	ampicilină	15,0
	meticilină	15,0
3—9 mg/ml (5 sușe)	streptomicină	16,4
	cloramfenicol	15,6
	teramicină	13,0
	eritromicină	19,0
	miacină	20,0
	sulfatiazol	13,0

*Tabelul 2*

**Sensibilitatea la antibiotice a stafilococilor cu sensibilitate redusă la propolis**

Sensibilitatea la propolis	Sensibilitatea la antibiotice : zona de inhibiție (medie) a culturii de stafilococi, în mm	
	penicilină	23,9
	ampicilină	23,2
	meticilină	20,1
12—15 mg/ml	streptomicină	24,8
	cloramfenicol	20,3
	teramicină	21,4
	eritromicină	23,4
	miacină	27,2
	sulfatiazol	28,6

*Tabelul 3*

**Sensibilitatea la antibiotice a stafilococilor rezistenți la propolis**

Sensibilitatea la propolis	Sensibilitatea la antibiotice : zona de inhibiție (medie) a culturii de stafilococi, în mm	
	penicilină	25,2
	ampicilină	25,5
	meticilină	23,2
18—21 mg/ml 28 sușe	streptomicină	26,7
	cloramfenicol	23,9
	teramicină	21,8
	eritromicină	24,9
	miacină	27,4
	sulfatiazol	32,2

## Concluzii

1. În majoritatea cazurilor, stafilococii izolați din materiale patogene au manifestat o sensibilitate redusă la propolis ; numai 10% din sușele testate au prezentat o sensibilitate comparabilă cu cea a sușelor de colecție. Reducerea sensibilității a fost, probabil provocată de modificările metabolice intervenite la aceste sușe, modificări care în afara organismului, pot fi demonstreate ca fiind de natură enzimatică. Intenționăm să aprofundăm cercetarea acestei probleme în viitor. Se pare, totuși, că sensibilitatea stafilococilor la propolis determinată *in vitro*, nu corespunde cu exactitate sensibilității manifestate de aceștia *in vivo*, deoarece în practica clinică au fost obținute rezultate bune prin administrarea propolisului în cazurile de infecții purulente.

Este cunoscut un fenomen similar — de neconcordanță a sensibilității bacteriilor la antibiotice — comparând examenul *in vitro*, cu rezultatele clinice.

2. Nu am observat existența unei corelații între sensibilitatea manifestată de stafilococii testați față de propolis și de antibioticele de uz curent. Este interesant că varietățile cu sensibilitate accentuată față de propolis au manifestat o puternică rezistență față de antibioticele utilizate. De această problemă avem intenția să ne ocupăm în mod amănușit în viitor.

## REAȚIA PLASMOCITARĂ LA ȘOARECII ALBI IMUNIZAȚI CU UN ANTIGEN ASOCIAȚ CU PROPOLIS

V. P. KIVALKINA

A. I. BALALIKINA

V. I. PIONTKOVSKI

U.R.S.S.

În lucrările noastre anterioare am comunicat că propolisul administrat împreună cu un antigen intensifică formarea anticorpilor, fagocitoza, activitatea complementară a serului sanguin și sporește conținutul de gammaglobulină (V. P. KIVALKINA).

Scopul cercetării actuale este de a studia influența propolisului administrat împreună cu un antigen, asupra reacției plasmocitare, care este unul din principali indicatori ai transformării imunologice a organismului, manifestat curind după imunizare.

**Material și metoda de lucru.** Cercetările s-au efectuat pe 137 șoareci albi. Ca antigen s-a folosit un antigen complex (complexul glucidolipoproteic) extras din *S. enteritidis*. Șoareci din prima grupă au fost imunizați cu antigen dizolvat în ser fiziological ; șoarecilor din a doua grupă li s-a administrat același antigen, emulsionat într-un amestec de lanolină și vaselină ; celor din a treia grupă, antigen emulsionat cu adaos de saponină, iar celor din a patra grupă, antigen emulsionat cu un stimu-

lator cu propolis. Antigenul a fost injectat o singură dată, subcutan, în regiunea gambei drepte. În a 3, 6, 10, 15, 20, 27, 34, 44, 58, 75 și a 90-a zi după imunizare trei șoareci din fiecare grupă au fost narcotizați cu eter, au fost deschiși și li s-au extras următorii ganglioni limfatici : popliteu drept, mezenteric, paraaortici, poplitei și subscalpulari stângi. Pe lamele preparate s-au numărat celulele din seria plasmocitară după metoda lui M. P. POKROVSKAIA și L. S. KOGANOVA (1974). Paralel cu studierea modificărilor citologice s-au titrat anticorpii în homogenate din organele limfatiche și din serul sanguin. Din organele limfatiche s-au preparat homogenate, s-au diluat cu ser fiziologic 1 : 10, 1 : 20 și s-au extras timp de 24 ore la temperatură de 4°, apoi s-au centrifugat, iar lichidul supernatant a fost supus unei reacții de aglutinare la fel ca și serul sanguin — după o metodă curentă.

Prin cercetările făcute anterior pe animale intacte, s-a stabilit că în 50 cîmpuri microscopice ale preparatelor din ganglionii limfatici regionali s-au găsit 6—9 celule din seria plasmocitară.

**Rezultatele cercetărilor.** Analiza citologică pe grupe a arătat că reacția imunologică la administrarea antigenului se manifestă cel mai intens și în cel mai scurt timp prin mărirea numărului de celule din seria plasmocitară în ganglionii limfatici regionali.

La șoareci albi imunizați cu antigen complex, dizolvat în ser fiziologic (grupa I), s-a constatat în a 3-a zi după imunizare o plasmoblastoză neînsemnată în ganglionii limfatici regionali. Cel mai mare număr de celule din seria plasmocitară (91) a fost găsit în a 6-a zi ; în continuare, nivelul acestora a avut un caracter ondulatoriu. În ganglionii limfatici periferici s-au observat modificări celulare similare, diferența constând numai într-o intensitate mai scăzută a reacției plasmocitare.

În homogenatele de ganglioni regionali anticorpii au fost evidențiați în a 3-a — a 6-a zi după administrarea antigenului și au atins numărul maxim (1 : 1280) în a 15-a zi. În ganglionii limfatici periferici apariția anticorpilor a început să se manifeste abia după a 15-a zi : cele mai ridicate titruri de anticorpi au fost constatațate mai tîrziu decît în ganglionii regionali (în a 34-a și a 75-a zi).

În a 3-a zi de experiență, în serul sanguin s-au titrat aglutinine 1 : 23. În continuare titrul lor a crescut brusc și a atins valoarea maximă în a 44-a zi (1 : 3460).

La animalele imunizate cu antigen complet, emulsionat în amestec de lanolină-vaselină (grupa a II-a) s-a observat în a 3-a zi de experiență o creștere a numărului de celule plasmaticice, cu predominarea plasmoblastelor. Numărul maxim (102) de celule din seria plasmocitară a fost fixat în a 10-a zi după imunizare. Ulterior, numărul lor a revenit la valoarea inițială, cu o creștere neînsemnată în a 58-a zi.

În homogenatele de ganglioni limfatici regionali s-au evidențiat anticorpi în a 3-a și a 6-a zi de studiu iar acumularea lor maximă (1 : 5120) s-a constatat în a 34-a zi și a 58-a zi. În ganglionii limfatici periferici, anticorpii au fost identificați în a 10-a zi, iar titrurile lor maxime în a 58-a zi de experiență. Creșterea titrurilor aglutininelor în homogenatele de organe limfaticice și de ser sanguin a fost paralelă, iar

în prima perioadă a observațiilor titrurile anticorpilor în homogenate au fost superioare celor din serul sanguin. Cea mai mare cantitate de aglutinine (1 : 3733) în serul sanguin a fost stabilită în a 44-a zi.

În ganglionii regionali ai șoareciilor albi imunizați cu antigen complet emulsionat în amestecul de lanolină-vaselină, cu adăos de saponină (grupa a III-a), în a 3-a zi s-a constatat o creștere neînsemnată a numărului de plasmoblaste. Numărul maxim de celule din seria plasmocitară (146) a fost fixat în a 6-a zi de observații. Ulterior s-a constatat reducerea nivelului acestora până la valorile inițiale, cu o creștere neînsemnată în a 44-a zi și a 90-a zi. În ganglionii limfatici periferici au avut loc deplasări celulare cu același caracter ca și în cei regionali, dar mai puțin intense.

În homogenatele de ganglioni limfatici regionali s-au evidențiat anticorpi în a 3-a zi după imunizare. Cantitatea maximă s-a observat în a 15-a zi — titrul 1 : 2560. Organele limfaticice periferice au intrat treptat în procesul genezei anticorpilor antrenarea lor complectă s-a observat în a 15-a zi ; în a 44-a zi de experiență ele conțineau cel mai mare număr de anticorpi. Titrul aglutininelor în serul sanguin și în homogenate a crescut odată cu predominarea lor cantitativă într-o perioadă scurtă după imunizare în homogenate. În serul sanguin cantitatea maximă de aglutinine la titrul 1 : 3733 s-a constatat în a 34-a zi, cînd în homogenatele de ganglioni limfatici regionali titrurile anticorpilor au scăzut.

La animalele imunizate cu antigen emulsionat în amestec de lanolină-vaselină cu adăos de propolis (grupa a IV-a), în a 3-a zi după administrare s-a observat creșterea numărului de plasmoblaste în ganglionii limfatici regionali. Acumularea maximă de celule din seria plasmocitară (544) s-a observat în a 6-a zi de experiență. Celulele plasmaticice se aflau în grupuri de cîte 5—20 în cordoanele mielinice din regiunea medulară și rareori în scoarța ganglionului limfatic ; printre ele predominau celule plasmaticice nemature. La observațiile următoare, numărul celulelor din seria plasmatică era redus sub normal. În a 20-a și a 27-a zi numărul lor a fost neînsemnat, predominau celulele plasmaticice mature. A doua creștere a numărului de celule din seria plasmocitară (117) s-a observat în a 34-a zi de observație ; către sfîrșitul experienței numărul s-a apropiat de normal. Ganglionii periferici au avut o reacție celulară cu caracter similar însă de intensitate mai slabă. Numărul maxim de celule din seria plasmocitară a fost constatat de asemenea în a 6-a zi după imunizare și apoi în cursul întregii experiențe a fost peste normal.

În homogenatele din ganglionii regionali s-au detectat anticorpi în a 3-a zi după imunizare. Nivelul lor a atins o valoare maximă în a 27-a zi, la titrul 1 : 10240, apoi s-a observat scăderea titrurilor, cu mărirea ulterioară repetată în a 58-a zi până la titrul 1 : 5120. Ganglionii limfatici îndepărtați au fost inclusi în geneza anticorpilor în a 6-a zi, cea mai intensă acumulare de anticorpi remarcindu-se în a 27-a zi. Nivelul anticorpilor în serul sanguin a urmat un curs ondulat cu sporul maxim în a 27-a zi, titrul diluției serului fiind egal cu 1 : 13866. La animalele din grupea respectivă titrul anticorpilor în homogenatele

de ganglioni limfatici regionali și în serul sanguin a crescut paralele cu cei mai ridicați indicatori din aceleași perioade.

Injectarea subcutanată a antigenului complet este deci însoțită de o transformare imunomorfologică în ganglionii limfatici, în care se acumulează celule din seria plasmocitară și anticorpuri specifici. În acest caz, la șoareci albi imunizați cu antigen complet cu propolis, proliferarea celulelor seriei plasmocitare în ganglioni limfatici regionali a fost de 6 ori mai intensă decât la indivizii din alte grupe.

Comparând datele cercetărilor morfologice și serologice am ajuns la concluzia că mărimea numărului de celule plasmatice în ganglionii regionali precedă acumularea anticorpilor specifici. În homogenatele de ganglioni limfatici regionali anticorpuri s-au evidențiat mai înainte decât în serul sanguin și erau prezente în titruri mai mari. Totuși în serul sanguin al șoareciilor albi inoculați cu antigen emulsionat cu propolis, anticorpuri au existat aproape în cursul întregii experiențe, în titruri mai mari decât în homogenate, aceasta pe seama antrenării active în geneza anticorpilor nu numai a ganglionilor limfatici regionali ci și a celor periferici. Titrurile aglutininelor au fost de 3,7—4 ori mai mari decât la animalele inoculate cu antigen complet în combinație cu alți adjuvanți. Aceleasi concluzii s-au stabilit și din compararea între grupe a titrurilor maxime ale anticorpilor în homogenatele din ganglionii regionali.

Din rezultatele cercetărilor efectuate conchidem că propolisul introdus în organismul animalelor de laborator în combinație cu antigeni stimulează reacția plasmocitară și formarea anticorpilor în organele limfatice regionale și periferice.

#### B I B L I O G R A F I E

KIVALKINA V. P., 1960 — „Al XXII-lea Congres Internațional de Apicultură, Moscova“.

#### EFFECTUL FRACTIILOR DE PROPOLIS ASUPRA SISTEMELOR BIOLOGICE — I

D. POPESCOVIĆ, M. DIMITRIJEVIĆ, B. SOLDATOVIĆ  
YUGOSLAVIA

Referitor la datele obținute din literatură este sigur că propolisul manifestă activități biologice multilaterale. Este posibil ca efectul polivalent al propolisului să-și aibă originea în heterogenitatea chimică.

În timpul examenelor noastre anterioare ale propolisului, am extras prin cromatografie pe coloană 15 fracții diferite din propolis. 5 din cele 15 fracții sunt pure din punct de vedere cromatografic și celelalte sunt un amestec de 2 sau 3 compoziții. Puritatea unor fracții a fost

testată prin cromatografie în strat subțire pe gel de siliciu. Toate fracțiile obținute sănt substanțe tari cu puncte de topire scăzute, în afară de două care sănt fluide, foarte viscoase. În cercetările noastre viitoare avem de gînd să diferențiem mai strîns fracțiile propolisului și în faza inițială prin teste biologice. Vom prezenta în acest articol numai rezultatele preliminare ale examenelor noastre asupra efectului a trei fracții de propolis de diverse concentrații pe celule mamare *in vitro*.

S-a studiat efectul fracțiilor B, D și E, fiecare în concentrație de 0,5%, 1,5% și 2,5%. Am folosit două grupe de culturi de celule cu martor :

a. culturi de celule expuse efectului de etanol în concentrație de 0,5%, 1,5% și 2,5%.

b. cultura generală fără nici un efect al altor compuși, în afară de cel al mediului.

S-au testat linii de celule stabile (fibrocite) din țesuturi de șoarece. Celulele au fost menținute în mediu Parker — 199 cu 20% ser de bovine și antibiotice. Celulele au fost expuse efectului de fracție și soluției timp de 12 ore. S-au stabilit 2 criterii pentru estimarea fracțiilor de propolis pe culturi celulare :

1. Determinarea indicelui mitotic și
2. Incidența aberațiilor cromozomice.

La sfîrșitul experiențelor preparatele au fost tratate cu metode standard, folosind și colcemidă, soluție hipotonică și fixative (alcool și acid acetic, 3 : 1).

Indicele mitotic s-a determinat ca procent din numărul de celule mitotice în raport cu numărul de celule numărate.

Din rezultatele noastre este evidentă existența diferențelor în activitatea mitotică dintre fracțiile de propolis. Fracția E manifestă o activitate mitotică de 2 ori mai mare decât frâcția D sau ca martorii. Etanolul în doze de 0,5% nu are o influență esențială asupra indicelui mitotic în comparație cu martorii.

Aceste fracții de propolis n-au provocat aberații cromozomice clare în afară de ridarea și leziunile obișnuite ale cromatidelor.

Se pare că rezultatele noastre corespund cu datele care sugerează o influență regenerativă a propolisului în unele țesuturi.

## INFLUENȚA UNOR EXTRACTE DIN PROPOLIS ASUPRA MITOZEI ÎN MERISTEME DE *ALLIUM CEPA L.*

N. POPOVICI, N. OIȚĂ  
ROMANIA

Cunoașterea unor cazuri de remisiune evidentă a unor tumorî maligne și a unor leucemii, remisiune consecutivă administrării de propolis în diferite forme, ne-a îndemnat la un studiu al mecanismului cito-

logic de acțiune al propolisului în cazul unor meristeme vegetale ale căror celule au fost dezechilibrate informațional, aşa cum sunt și celele canceroase.

În această lucrare, prezentăm unele rezultate cu totul preliminare ale experiențelor noastre în acest sens, efectuate pe meristemele radiculare de *Allium cepa* L., la care am urmărit desfășurarea mitozei sub aspectul frecvenței și al normalității structurale.

### Material și metodă de lucru

Bulbii înrădăcinați de ceapă *Allium cepa* L., având numeroase rădăcini de 2—3 cm, după un examen sumar al normalității mitozei, au fost trecuți pe o soluție de „proposept“ (extract alcoolic din propolisul natural, solubilizat în apă prin adaoș de etilen-diamină) sau pe o soluție mixtă de griseofulvină saturată (cca 10 mg/l apă) plus „proposept“ 0,20%. La intervale de 24 de ore colectam cîte 5 rădăcinuțe pe care le fixăm în fixator Battaglia, apoi le colorăm după Feulgen și le aplicăm preparația „squash“. În aceste preparate, permanentizante am urmărit evoluția mitozei prin observații calitative și numărători stabilind frecvența celulelor în diviziune și starea mitozei.

### Rezultate și interpretări

*Experiența I.* S-a realizat punind bulbi înrădăcinați să-și continue creșterea pe o soluție apoasă 1% de „proposept“. Această concentrație este destul de mare ca efectul, eventual citostatic pe care îl au sugerat remisiunile cunoscute de cancer și leucemii, să se manifeste din plin și rapid, ceea ce observațiile noastre au confirmat din plin. Frecvența mitozei a diminuat treptat, ea dispărind din meristemele rădăcinilor aproape total după 48 de ore de contact al rădăcinilor cu soluția de propolis 0,1%. Ceea ce însă trebuie remarcat în mod deosebit este faptul că acest efect mitodepresiv, destul de evident, nu este însoțit de nici o modificare structurală a mitozei, de nici un fel de deregulare a fusului acromatic (mitoclazie) și nici de apariția vreunui fel de aberație cromozomială, sau de efecte consecutive adică punți, fragmente, micronuclei, cuprinse în noțiunea de cromatoclazie.

Acest fapt ni se pare deosebit de important, deoarece considerăm că o substanță oncolitică (sau cel puțin oncostatică), trebuie să fie mitodepresivă, nu are voie să fie generatoare dedezchilibre informaționale, fie și sub forma de mutații cromozomiale (aberații) sau genomicice (poliploide, aneuploide, etc.). Este cunoscut că multe tipuri de cancer se caracterizează tocmai prin astfel de modificări numerice de cromozomi ceea ce condiționează, în primul rînd creșterea anarchică și invazivă, ca semne ale neintegrării sistematice a celulelor maligne în organism.

In acest stadiu, am întrerupt influența propolisului, trecînd bulbii să-și continue creșterea pe apă de robinet. Observațiile ulterioare asupra meristemelor ne-au arătat că, la numai 24 de ore de la întreruperea influenței, reapar mitoze, și mai ales într-o structură perfect normală. La frecvență normală a mitozei, meristemele ce au fost tratate cu propolis ajung la cca. 72 de ore de la încetarea acțiunii acestuia, cînd și creșterea rădăcinilor este reluată.

Așadar, o primă concluzie privitoare la influența propolisului asupra mitozei în celule meristemice normale a fost practic enunțată și doar o reformulăm :

— propolisul conține principii mitodepresive care nu generează anomalii mitotice sau aberații cromozomiale, cu acțiune energetică dar reversibilă după încetarea acțiunii lui.

De la o substanță oncolitică sau oncostatică am mai putea pretinde doar ca acțiunea ei mitodepresivă să fie cel puțin egală sau mai mare asupra unor celule dereglate informațional (cum sunt celulele canceroase) și, dacă s-ar putea, reinstalarea mitozei în acestea să nu mai fie posibilă.

*Experiența a II-a.* Am considerat interesant să administram „prosept“ unor celule dereglate sub aspectul integrității aparatului genetic, chiar dacă nu în sensul malignizării. Am ales ca agent deregulator griseofulvina care aşa cum se știe din literatură și aşa cum știm din rezultate proprii nepublicate, deregleză foarte puternic și total mitoza, inducind pseudometafaze, pseudoanafaze și pseudotelofaze de tip colchicinic, dar și — foarte frecvent — anafaze multipolare, care duc la celule plurinucleate cu nuclei inechivalenți și deficitari sub aspectul conținutului genetic. La concentrația de 10 mg/l (soluție apoasă saturată) cu care am lucrat, după 24 de ore de acțiune putem găsi o frecvență ușor sporită a mitozei (un index mitotic crescut) dar absolut toate figurile mitotice erau modificate. După cca. 4 zile de acțiune, mitoza dispare, dar aproape toate celulele meristemice sunt plurinucleate și poliploide. Probabil că starea plurinucleată împiedică și intrarea în mitoză, de unde o situație de mitodepresie.

Influența propolisului adiționat la proba experimentală în proporție de numai 0,02% (ca soluție apoasă mixtă) este foarte semnificativă, cu atât mai mult cu cît concentrația lui este de 5 ori mai mică decît în prima experiență.

Față de proba tratată numai cu griseofulvină, la proba cu griseofulvină + propolis acțiunea mitodepresivă (a propolisului) se instalează foarte energetic mai ales asupra celulelor în mitoză dereglată care dispar rapid, persistând mai mult timp doar mitozele cu slabe dereglații ca metafaze și anafaze ușor dispersive cu retardanți, etc.

Probabil că propolisul, în cumul cu griseofulvina, blochează pregătirile pentru mitoză în special în celulele dereglate informațional (genetic), și din această cauză nu mai apar mitoze profund dereglate, ca sub influența griseofulvinei administrată singular.

În aceste condiții, după cca. 3 zile, mitoza din meristeme dispare total dar, datorită propolisului și efectului lui mitodepresiv, nu apar celule plurinucleate. Aceasta ne-ar duce la concluzia că efectul mitode-

presiv al propolisului este mult mai energetic asupra mitozei anormale și asupra celulelor deregulate genetic decât asupra celulelor normale, ceea ce — așa cum am mai spus — ar fi o pretenție majoră față de o substanță oncolitică sau cel puțin oncostatică.

Mai trebuie remarcat că, după înlăturarea soluției de griseofulvină plus propolis și trecerea bulbilor pe apă, nici la 5—6 zile mitoza nu reapare sub nici o formă — normală sau modificată — în meristemele radiculare astfel tratate. Aceasta ne-ar duce și la ideea că principiile mitodepressive din propolis acționează mai energetic și mai de durată la nivelul celulelor meristemice în care s-a manifestat o deregulare sau o tendință de deregulare genetică. Aceasta ar crea un decalaj de proliferitate în favoarea celulelor normale, ceea ce ar favoriza regenerarea unui ţesut meristemnic normal în locul celui afectat de un agent de-regulator.

### Discuții

Dacă admitem o similitudine de acțiune a principiilor mitodepressive asupra celulelor deregulate informațional (genetic) prin griseofulvină sau prin malignizare, atunci remisiunile de cancer — leucemii — la care ne-am referit la începutul lucrării s-ar explica astfel.

Un ţesut nu se malignizează absolut total; în el vor mai rămâne celule normale, oricără de puține, dar a căror activitate este dominată sau chiar reprimată de celule maligne. Propolisul, reprimând preferențial și de durată celulele maligne, ar favoriza — fie și indirect — activitatea celor normale, ceea ce ar contribui la restabilirea stării normale a organismului. Astfel, evoluția malignă ar putea fi începutină sau chiar opriță, dacă nu eradicate din organism.

Chiar dacă nu admitem o acțiune oncolitică sau oncostatică a principiilor mitodepressive din propolis, atunci experiențele descrise ne sugerează un principiu mai general în cercetările de terapeutică a cancerului.

După părerea noastră, pentru tratarea cancerului nu trebuie căutate citostatice puternice care ar afecta obligatoriu și celulele normale în diviziune permanentă (epiteliale, hematopoetice, etc.) din organismul uman ducând eventual la malignizarea lor, ci ar fi necesare (și suficiente) citostatice și citotoxice slabe. Acestea ar afecta puțin sau deloc celulele normale, care dispun de o puternică homeostazie celulară prin faptul integrării lor normale în sistemul organismal, dar ar afecta puternic, pînă la distrugere, celulele maligne, dezechilibrate informațional, neintegrate sistemic în organism și care în urma acestui fapt dispun de o homeostazie fiziologică slabă, fiind mai ușor de distrus și eradicat.

Noi presupunem că extractele de propolis posedă asemenea virtuți, deși sunt necesare numeroase experimentări de laborator și de clinică, în eventualitatea realității unor efecte oncostaticice sau oncolitice a extractelor la care ne-am referit.

## **Concluzii**

1. Propolisul conține principii mitodepresive dar care nu sunt generatoare de anomalii mitotice sau aberații cromozomiale, iar acțiunea lor este reversibilă în cazul celulelor meristemice normale.
2. La administrarea concomitent cu un degenerator al mitozei cum este griseofulvina, acțiunea mitodepresivă se prezintă ca deosebit de energetică asupra celulelor dereglate genetic și mai ales pare a fi ireversibilă.
3. Experiențe ulterioare trebuie executate pentru a stabili legătura între unele remisiuni cunoscute de cancer și leucemii umane consecutive administrării de propolis și efectele citologice ale propolisului constatate de noi pe meristeme radiculare vegetale.

## **PROPOLIS — PROBLEME DE FARMACOCHIMIE ȘI FARMACODINAMIE**

G. VELESCU, M. MARIN  
ROMANIA

Pe an ce trece propolisoterapia cîștigă tot mai mult teren, argumentele în favoarea ei fiind din ce în ce mai numeroase.

Lucrările avînd ca scop fundamentarea științifică a introducerii în terapeutică a propolisului că atare sau sub diverse forme galenice, s-au orientat atât spre cercetările de farmacodinamie cât și spre separarea și identificarea componentelor active din acest produs complex.

Caracterizarea propolisului prin determinările unor constante fizico-chimice a preocupat un număr destul de mare de cercetători, însă valorile obținute pe diferite probe ale acestui produs fiind atât de diferite nu pot constitui indicații precise privind calitatea acestuia.

Pentru exemplificare: conținutul în cenușă este dat de unii autori între 1,9 și 2,7% (1) pe propolisul liberat de ceară. Noi am găsit pe diferite probe de propolis o medie de 4% cenușă.

După HEICHUSCHKO și VOGEL punctul de fuziune a fost găsit la 67°C, autorii recomandînd limita inferioară la această consanță 90°C.

Noi am obținut pe propolisul purificat p.fz. = 81—83°C.

Greutățile specifice au fost date la 1,033 : 1,121 și 1,145.

Indicele de iod a fost obținut între 19,0 și 21,8 pentru propolis iar pentru răsina componentă între 30 și 50.

Propolisul este solubil în alcool, eter, benzen, propilen-glicol, acetona, cloroform și alții solvenți organici.

Solubilitatea propolisului în solvenții menționați diferă la fiecare dintre ei, în funcție de temperatură, în toate cazurile rămînînd reziduurile alcătuite în majoritate de impurități mecanice. Pentru depistarea principiilor active din propolis, cercetările începute cu aproximativ cinci decenii în urmă și continuat și în prezent au identificat din grupa flavonelor: chrizina (JAUBERT 1927); tectochrizina și galangina (VIL-

LANUEVA, BARBIER, GONNET și LAVIE 1963 (2) ; acacetina ; 5 oxi-7,4 dimetoxiflavona ; kaempferida; rhamnocitrina; 5,7-dioxi-4-dimetoxiflavona ; 3,5-dioxi-7,4-dimetoxiflavona ; pinostrobina, cvercetina 3).

De asemenea s-au identificat 2 terpene și izovanilina.

Concentrațiile în flavone pe probele studiate au fost între 1% — 4%. Cercetătorii CIŽMARIK și MATEL identifică în propolis acidul cafeic și acidul 4 oxi-3 metoxicinamic (ac. ferulic) (4).

De remarcat faptul că atât speciile chimice identificate cât și procentele acestora în diferite sorturi de propolis variază în funcție de regiune, floră și condiții climatice, neputindu-se corela cu precizie datele analitice cu rezultatele farmacodinamice obținute. Printre testările efectuate în laboratoare au fost cele care au demonstrat prin antibiopteme și fungigrame proprietățile antimicrobiene și fungistatice ale soluțiilor alcoolice sau ale emulsiilor de propolis.

Emulsia hidroalcoolică de propolis a avut o acțiune bacteriostatică față de *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus* sp.; *B. anthracis*, *Erysipelotris rushioptiae* (5).

Alți cercetători au dovedit prin fungigrame acțiunea remarcabilă a extractelor de propolis față de dermatofitii : *Microsporum ferrugineum*; *Trichophyton equineum*; *T. verrucosum*; *T. tonsurans* și *T. violaceum* (6). Se observă totuși variații notabile în acțiunea antifungică a diferitelor sorturi de propolis (6). Alți cercetători au demonstrat sensibilitatea față de propolis a unor tulpini de *Str. hemolyticus*; *Staph. albus*; *B. paratyphi*; *B. necrophorus*; *Pasteurella*; *Brucella*; *Listerella*; *Proteus vulgaris*; *B. tuberculosis* etc. (7, 8).

Testările *in vitro* ale activităților bactericide și fungistatice au avut rolul de a explica parțial succesele unor tratamente empirice cu propolis.

Alte cercetări au arătat că propolisul distrugă flagelatele : *Trichomonas hominis* și *T. bovis*.

### Cercetări de farmacodinamie

Cercetările privind toleranța animalelor față de propolis au relevat următoarele aspecte (9) : administrarea orală la cîini a cîte 100 ml emulsie de propolis (alcool 10%), timp de 10—20 zile, nu modifică starea generală a animalelor. După sacrificare nu s-au constatat modificări ale mucoaselor digestive și urinare. Ficatul și rinichii normale. Administrarea la cîini a propolisului sub formă de pilule cu unt de cacao a arătat că acesta se dispersează uniform pe întreaga mucoasă gastro-intestinală, fapt constatat prin sacrificarea animalelor la diferite intervale de timp în decursul a 24 ore de la administrare.

Pentru calea internă, emulsia hidroalcoolică de propolis și pilulele cu unt de cacao reprezintă forme utile de administrare.

Injectarea intravenoasă a emulsiei hidroalcoolice (50 ml la cal, 10 ml la cîine, 5 ml la iepuri) timp de 7 zile conduce la o accelerare a pulsului și a respirației timp de cîteva minute după injecție. Sacrificînd cîteva animale, s-au constatat focare de necroză.

Nu se recomandă injectarea intravenoasă. Înregistrând presiunea sanguină în urma injectării emulsiei pe cale venoasă (2,5—5 ml sol. 10%) se constată că presiunea singelui scade, iar respirația devine mai amplă.

Cercetările pe intestin izolat de iepure demonstrează că propolisul diminua tonusul și amplitudinea mișcărilor peristaltice.

Cordul izolat de broască răspunde prin acțiune cronotropă negativă (răuirea contractiilor) și inotropă (mărire puterii de contracție).

*In vivo*, propolisul sub formă de emulsie hidroalcoolică combată și diminuează șocul histaminic. Injectând intravenos histamina, la iepuri, aceștia fac un șoc brutal, la unii indivizi soldindu-se cu moartea. La inocularea a 3—5 ml emulsie propolis (4 ml extract alcoolic la 20 ml apă distilată) pe cale intravenoasă, înainte sau imediat după injectarea histaminei, animalele fac un șoc redus ca intensitate și își revin la normal după 3—5 minute. În afara acestor observații farmacodinamice ce explică unele aspecte ale propolisoterapiei, au fost întreprinse cercetări privind tratamentul arsurilor termice și al eczemelor pruriginioase umede la ciini.

Unui număr de 8 ciini li s-au provocat arsuri în cerc cu diametrul de 5 cm, pe pielea dorsală, cu apă cloicotă fără anestezie. Lotul mărtor a fost format din 4 ciini. Tratamentul lotului experimental s-a făcut la 4 ciini cu unguent propolizat 10% și la 4 ciini cu eter propolizat 10% timp de 7 zile (9).

Din lotul mărtor 2 ciini au fost tratați cu vaselină simplă și 2 cu eter. S-a constatat că propolisul, mai ales sub formă de soluție eterată, combată plasmoragia, formează o peliculă protectoare, asigură asepsia și anestezia și duce la vindecare în timp de 10—12 zile față de lotul mărtor, care s-a vindecat după 15—20 zile (9).

Rezultatele bune au fost obținute tratând un număr de 12 ciini afectați de eczemă umedă pruriginioasă cu ajutorul unguentului propolizat 10%. Rezultate mai bune au fost obținute asociind aplicarea exterană a propolisului cu injecții de novocaină 1% perifocal. Foarte interesantă este, deosemenea, comunicarea făcută de către V. N. AMELEV-SKAIA, V. S. VLADIMIROVA, L. A. BARAN și V. V. CEKMAN la cel de-al XX-lea Congres internațional de apicultură de la București, cu privire la utilizarea propolisului în bolile de iradiație.

Experimentările efectuate de noi în acest sens au demonstrat că soluțiile alcoolice și emulsia hidroalcoolică, administrate intern la ciini (150 ml emulsie 35%) săn slab radio-opace în comparație cu lipiodoul și urombralul (9).

Experiențe efectuate pe cobai imunizați cu antigen cu propolis au demonstrat o stimulare nespecifică a reactivității organismului, cu creștere de 3,7—4 ori mai intensă a anticorpilor, față de lotul mărtor (10).

Extractele de propolis s-au folosit cu succes în dermatitele de origine aftoasă, experimentările fiind făcute pe 2 000 animale și s-a constatat că propolisul reduce timpul de vindecare, este bactericid, anesteziant și nu produce efecte adverse (11).

Soluțiile alcoolice de propolis experimentate pe un număr de 500 bolnavi de tricofitie au dat rezultate satisfăcătoare la 82% din cei tra-

tați, fără apariția efectelor adverse (12). Extractele apoase, hidroalcoolice și oleoase de propolis au fost administrate peroral și intratraheal la un număr mare de bolnavi t.b.c. cu rezultate superioare tratamentelor cu medicamente cunoscute (13).

Cu titlul informativ arătăm că eczemele alergice prurigoase la om (în special cele contractate în depozitele de cărți) au beneficiat de tratamentul cu unguent propolizat.

### Concluzii

Din cele expuse reținem că rezultatele analizelor fizico-chimice ale propolisului furnizează valori atât de diferite în concentrațiile principiilor active cunoscute, încit o caracterizare eficientă a calității acestui produs prezintă încă lacune.

Cercetările farmacodinamice fundamentează totuși extinderea utilizării în practica medicală a propolisoterapiei.

Se remarcă în special reducerea timpilor de vindecare, rezolvările obținute în cazurile unde alte tratamente au eşuat și capacitatea pe care o are propolisul de a stimula imunoreacțiile nespecifice. Aceste aspecte caracterizează o cinetică crescută a unor reacții termodynamice posibile, între principiile active și substratul tratat, fapt care ne-a îndrumat spre ipoteza existenței în propolis a unor sisteme enzimatiche care din cîte cunoaștem nu au fost cercetate pînă în prezent.

În laboratorul de patologie al Institutului de cercetări pentru apicultură s-a separat, identificat și stabilit metoda de determinare a activității unei transhidrogenaze anaerobe existente în propolis.

Identificarea acestei enzime va permite lămurirea unor probleme legate de farmacodinamia produselor de propolis. Stabilirea metodei de determinare a activității enzimatiche completează condițiile de calitate cerute la acest produs printr-un parametru riguros.

### B I B L I O G R A F I E

1. WARTH Albin, *The chemistry and technology of Waxes*, Ed. 1960, p. 97
2. CHAUVIN R. *La biologie de l'abeille* vol. II. Les produits de la ruche
3. POPRAVKO S. A. Separarea și identificarea compușilor din propolis, *Congresul internațional de apicultură* Moscova 1971
4. CIZMARIK J., MATEL J. *Congresul XXII internațional de apicultură*, Moscova 1971
5. MARIN M., MATEESCU T., BALACI P., POPA Al. *Apicultura* 1959 nr. 12
6. BRAILEANU Cl. și col. Cercetări asupra unor forme farmaceutice cu propolis. *Apicultura* 1968 nr. 8.
7. KIVALKINA V. P. *Pcelovodstvo*, 1969, nr. 10
8. KARIMOVA Z. H., RODIONOVA E. J. *Pcelovodstvo* 1963, nr. 1
9. MARIN, M., POPA Al., POPESCU N., ȘERBAN M., SUTEANU A. *Valoarea alimentară dietetică și terapeutică a produselor apicole*, Ed. Agro-Silvică, București 1957

10. KIVALKINA, V. BALALIKINA, V. L., PIONTKOVSKI, S. V. Reacția plasmocitară la cobaii imunizați cu antigen cu propolis. *Congresul internațional de apicultură*, Moscova 1971
11. CEANIȘEV Z. G. Folosirea propolisului în dermatitele de origine afloasă, *Congresul XX internațional de apicultură* 1965
12. BOLSAKOVA I. Folosirea propolisului în dermatologie, *Congresul XXIII internațional de apicultură*, Moscova 1971
13. KARIMOVA E. și RODIONOVA P. R. Propolisul în tratamentul complex al tuberculozei pulmonare și a bronhiilor, *Congresul XXIII internațional de apicultură*, Moscova 1971

## STUDIUL ACTIUNII ANTIMICROBIENE A PROPOLISULUI ASUPRA MICROFLOREI TRACTULUI GASTROINTESTINAL

S. E. PALMBABA  
U.R.S.S.

Folosirea îndelungată a antibioticelor și produselor sulfamidice provoacă deseori apariția formelor rezistente ale microorganismelor patogene. Aceasta ne îndeamnă să căutăm noi produse medicamentoase care să nu fie inferioare ca putere și mărime a spectrului de acțiune.

Cercetările efectuate cu propolis indică eficiența folosirii lui în medicina umană: dermatologie, chirurgie, stomatologie, otorinolaringologie, ginecologie. Produsele din propolis se pot folosi cu succes și în medicina veterinară: în febra afloasă, necrobaciloză, bronhopneumonia enzootică, dispepsia toxică, paratifoza, mastitele stafilococice, plăgile infectate.

Pe baza rezultatelor cercetărilor experimentale și a folosirii practice a produselor preparate din propolis, la Institutul de medicină veterinară din Kazan au fost elaborate „Recomandări cu privire la folosirea propolisului în medicina veterinară“ (V. P. KIVALKINA, J. F. KAZAKOV, 1962) în care se prevede folosirea perorală a propolisului ca mijloc terapeutic și profilactic împotriva bolilor gastro-intestinale și pulmonare veterinară.

În legătură cu aceasta, de mare importanță practică este studiul acțiunii propolisului asupra microflorei tractului gastro-intestinal. Studiul complex multilateral al diferitelor însușiri ale propolisului va crea premise pentru folosirea acestuia ca materie primă în producerea industrială a unor noi medicamente naturale.

Lucrarea își propune studierea influenței propolisului *in vitro* și *in vivo* asupra principalilor reprezentanți ai microflorei gastro-intestinale.

Acțiunea antimicrobiană a propolisului *in vitro* a fost urmărită pe culturi de colibacili, enterococi, bacterii acidolactice obișnuite intestinului gros la animale, precum și pe culturi de stafilococ (tulpina etalon 209 și de laborator 39) și de bacterii acidofile.

Avinđ în vedere că însușirile antimicrobiene ale propolisului provenit din stupinele din R.S.S. Letonă nu au fost studiate de nimeni pînă

acum, am studiat 9 probe de propolis adunat din zone diferite ale unor raioane din R.S.S. Letonă. Am determinat acțiunea bactericidă și bacteriostatică a propolisului nativ, introdus în mediile nutritive precum și acțiunea bactericidă și bacteriostatică a extractului alcoolic de propolis. Am stabilit conținutul de ceară în propolisul nativ și de substanță uscată din extractul alcoolic.

Rezultatele cercetărilor au arătat că toate probele de propolis au o acțiune antimicrobiană pronunțată. Acțiunea bactericidă a propolisului nativ atât în ceea ce privește stafilococul cît și colibacilul s-a manifestat după 2—4 ore, iar la enterococ după 1—3 ore.

Extractul alcoolic de propolis 20% diluat cu apă distilată (1 : 5) a provocat moartea enterococului după 10—15 minute, a stafilococului după 20—30 minute și a colibacilului după 35—40 minute. În mediul de agar carne-peptonă creșterea stafilococului a început după introducerea în 100 ml mediu a 0,05—0,25 ml extract alcoolic de propolis 20%, a enterococilor cu 0,25—0,5 ml și a colibacilului cu 3—9 ml, iar în bulionul de carne-peptonă, respectiv 0,5—1,5 ; 1,5—2 și 5—10 ml.

Acțiunea bacteriostatică în agarul carne-peptonă s-a observat în raport cu stafilococul după introducerea în 100 ml mediu a 0,05—0,025 g propolis, cu enterococul — 0,1—0,5 și cu bacilul intestinal 6—7 g, iar în bulionul din carne-peptonă 0,1—0,25 respectiv 0,5 și 7—9.

Acțiunea bacteriostatică în raport cu bacteriile acidolactice s-a manifestat după adăugarea în lapte a 4—6 g propolis nativ, precum și după adăugarea a 3—6 ml extract alcoolic 20% de propolis.

Probele de propolis au conținut 1,5—31,1% ceară și extractul alcoolic 20% — 0,101—0,154 g substanță uscată la 1 ml. În extractul alcoolic preparat din proba de propolis cu conținut de 1,5 ceară, s-a găsit 0,147 g substanță uscată într-un ml, iar în extractul obținut din propolis cu conținut de 31,1% ceară — 0,103 g într-un ml.

Studiul influenței folosirii perorale a emulsiei în apă-alcool de propolis asupra microflorei intestinale s-a făcut în 1968—1969 pe 39 purcei din rasa Marele alb, în vîrstă de 30 zile și la 20 iepuri de casă adulți rasa chinchilla.

Animalelor li s-a administrat timp de 30 de zile peroral extract alcoolic 20% de propolis sub formă de emulsie în apă-alcool 0,5 și 5% în doză de 4 ml la 1 kg greutate vie (concentrația de 0,5% a corespuns în recomandările dozei indicate).

Au fost cercetate bacteriologic probele din fecale luate de la animale la intervale de 10 zile de 5 ori înainte de administrarea preparatului, de 3ori — în perioada administrării și de 2 ori — după administrare. S-a determinat numărul de colibacili, bacterii acidofile, enterococi, *Clostridium perfringens*. La iepurii de casă, în plus s-a determinat numărul total de bacterii care cresc în condiții aerobe pe agar obișnuit de carne-peptonă.

În experiențele cu purcei au fost cercetate bacteriologic 400 de probe de fecale și s-au făcut 3 200 de înșămîntări, la iepuri — 200 probe de fecale și 1 600 înșămîntări.

În administrarea perorală a propolisului împotriva microflorei tractului gastro-intestinal s-a studiat numărul de colibacili și de bacterii

acidofile în grupele martor și experimentale la purceii de 30 de zile și la purceii în vîrstă de 70 de zile; numărul ambelor categorii de bacterii a scăzut brusc. Numărul bacteriilor acidofile însă a continuat să se reducă pînă la sfîrșitul cercetărilor. Conținutul de enterococi și *Clostridium perfringens*, în diferite perioade ale experienței a variat — în sensul creșterii sau al diminuării acestuia. Cu toată reducerea conținutului de colibacili, aceștia rămîneau un grup predominant de microorganisme pînă la sfîrșitul experienței. Al doilea loc ca număr l-au ocupat bacteriile acidofile, iar către sfîrșitul cercetărilor al treilea loc — enteroococi.

În procesul cercetărilor bacteriologice am observat oscilații mari în conținutul de microorganisme la unii indivizi din cadrul uneia și aceleiași grupe, aflate în aceleasi condiții. Modificările cantitative în compoziția microflorei fecalelor la purceii și iepurii experimentali, evidențiate prin cercetări bacteriologice, nu au depins de influența emulsiei în apă-alcool de propolis, intrucît au avut loc și la animalele din grupele martor. Prelucrarea statistică a arătat că modificările cantitative în conținutul microorganismelor prin folosirea pe cale internă a propolisului nu sunt semnificative. Aceasta ne permite să tragem concluzia că folosirea perorala îndelungată a emulsiei de apă-alcool cu propolis nu duce la disbacterioză, ceea ce prezintă mare importanță practică.

#### B I B L I O G R A F I E

KIVALKINA V. și KAZAKOV I., 1962 — Recomandări privind utilizarea propolisului în medicina veterinară, Moscova (în l. rusă).

#### EFFECTUL PROPOLISULUI ASUPRA UNOR SPECII DE MICROORGANISME ȘI MUCEGAIURI

L. VECHEȚ  
CEHOSLOVACIA

În prezent se acordă o deosebită atenție studierii propolisului, nu numai în domeniul apiculturii, ci și în sfera chimiei și medicinei. Pe noi ne-a interesat propolisul nu numai în calitate de apiculțor, dar și ca micolog, lucrînd în industria producției de antibiotice. Prezentăm aici doar în scop orientativ prima parte a lucrării noastre, de dimensiuni mai ample, care are, fără îndoială, lipsuri inerente.

Propolisul este un produs apicol natural care — cităm din *Der Imkerfreund* — conține circa 55% substanțe răšinoase și cleuri, 10% uleiuri volatile, 30% ceară și 5% polen. La rece, propolisul se prezintă ca o substanță solidă și friabilă, iar la cald devine moale, maleabil și foarte lipicios, aderent. După cum confirmă și BRENNER, culoarea sa este castanie, roșiatică pînă la verzuie. Calitatea acțiunii antimicrobiene a propolisului este — după SMID — puternic influențată de

sursa din care acestea provine. VILLANUEVA și colaboratorii arată că partea cea mai activă a propolisului este reprezentată de galangină, respectiv 3, 5, 7-trihidroxiflavonă. În plus, încă din anul 1927 sînt cunoscute flavonele chrizină și tectochrizină. Aceste flavone sunt — după LAVIE — întotdeauna conținute în cleurile mugurilor de plop. Ar fi deci corect să presupunem că propolisul își are originea pe mugurii copacilor.

### Descrierea experimentului

Scopul experienței a fost elaborarea unei aprecieri privind acțiunea antimicrobiană a propolisului asupra unor specii de microbi, mucegaiuri și drojdiei. După sistemul de clasificare a bacteriilor al lui BERGEY, au fost determinate următoarele specii: din ordinul *Eubacteriales*: *Escherichia coli* 9637/37, *Micrococcus flavus* ATCC 10 240, *Micrococcus lysodeicticus* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* P—1485, *Sarcina lutea* ATCC S 341, *Streptococcus cremoris* NIRD 185, *Corynebacterium equi* CSAV 184, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* BL 750, 2 g, *Bacillus antracoides*; din subîncrengătura *Eumycophyta*: *Fusarium solani* 257; *Aspergillus orchraceus* 511; din drojdiile familiei *Endomycetaceae* (*Saccharomycetaceae*): *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2611; din familia *Cryptococcaceae*: *Kloeckera apiculata* BU CSAV și *Candida albicans*.

Lucrarea se împarte în trei părți:

Prima parte examinează efectele generale ale propolisului asupra speciilor de bacterii, mucegaiuri și drojdiei testate.

În a doua parte a experienței s-a pus problema precizării efectelor antimicrobiene ale propolisului.

În partea a treia s-a determinat eficiența propolisului, comparativ cu acțiunea antimicotică a penicilinelui și fungicidinei.

Propolisul utilizat în cursul experienței provine atât din zona nordică a orașului Praga, cât și din regiunea munților Jizerské. Ca solvent s-a folosit alcoolul etilic 96%. Raportul dintre propolis și alcoolul etilic, la dizolvare, a fost întotdeauna 1 : 3, din cauză că această proporție asigură o dizolvare mai facilă și evită saturarea soluției. Propolisul cu alcool etilic a fost turnat, în continuare, într-un flacon Erlenmayer cu capacitate de 300 ml, astupat cu un dop din material plastic; flaconul a fost amplasat pe agitator și agitat la temperatură de 31°C timp de 36 ore, în întuneric. Conținutul flaconului a fost apoi filtrat, printr-un filtru de hîrtie, în scopul de a se înlătura materialul inert și propolisul nedizolvat. Propolisul dizolvat în alcool etilic a fost păstrat la adăpost de lumină, la o temperatură de 12°C. Pentru a se asigura omogenitatea mostrelor, în fiecare etapă de cercetare a fost preparată întotdeauna o singură doză de propolis dizolvat în alcool etilic.

Ca material microbian inițial am utilizat microbi conservați pe ser de cal, liofilizați.

Ca mediu lichid de cultură inițial s-a folosit bulionul glucozat. Bacteriile au fost cultivate timp de 24 ore la temperatură de 37°C, mu-

cegaiurile — 10 zile la temperatura de 31°C, drojdiile — 48—72 ore la temperatura de 25°C. Cultura în bulion a fost ținută la rece, fiind utilizată întotdeauna numai timp de cîteva zile. În vederea conservării ulterioare, cultura a fost însămîntată pe agar înclinat, a fost cultivată un anumit timp și apoi păstrată la temperatura de —5°C. Din cultura astfel conservată, microorganismele pot fi prelevate și însămîntate din nou pe bulion glucozat. Pentru experiențele propriu-zise s-au folosit medii solide, în majoritatea cazurilor agar-singe. Pentru testarea eficienței relative în comparație cu antibiotice a fost utilizat agarul. Pentru mucegaiuri au fost utilizate medii Sabouraud.

În locul plăcilor Petri obișnuite au fost folosite plăci din material plastic, care săn mai joase. Placa superioară se sprijină (în cazul metodei Heatly) pe role de oțel, ceea ce reduce în mod considerabil evaporarea alcoolului etilic.

Filtrele de hîrtie și rolele de oțel s-au sterilizat într-un sterilizator cu aer cald, la temperatură de 160°C, timp de 3 ore.

### Rezultatele experienței

#### Partea I

Pentru determinarea sensibilității unui microorganism la propolis au fost utilizate benzi de hîrtie de filtru cu dimensiunea de 205 mm și rondele cu diametrul de 10 mm. Sensibilitatea a fost experimentată pentru toate cele 15 specii de microorganisme supuse testării. Hîrtiile de filtru și rondelele au fost umezite cu soluția de propolis în alcool etilic, astfel încît să nu se scurgă soluție pe mediul solid. Simultan cu sensibilitatea la propolis s-a determinat și sensibilitatea diferitelor categorii de microorganisme față de alcoolul etilic. Rezultatul a fost negativ.

*Tabelul 1*

#### Rezultatele testării sensibilității

<i>Escherichia coli</i>	+
<i>Micrococcus flavus</i>	++
<i>Micrococcus lysodeicticus</i>	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	++
<i>Sarcina lutea</i>	++
<i>Streptococcus cremoris</i>	++
<i>Corynebacterium equi</i>	++
<i>Bacillus licheniformis</i>	++
<i>Bacillus antracoides</i>	++
<i>Bacillus subtilis</i>	+++
<i>Fusarium solani</i>	+++
<i>Aspergillus ochraceus</i>	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+++
<i>Kloeckera apiculata</i>	+++

Explicații :      +++ sensibilitate maximă  
                   ++ sensibilitate medie  
                   + sensibilitate minimă

## Partea a II-a

Majoritatea microorganismelor din prima parte a experimentului au fost utilizate și în partea a două, în care s-a stabilit cu precizie sporită efectul antimicrobian al propolisului. Eficiența propolisului a fost determinată cu ajutorul metodei Heatley, respectiv cu role de oțel cu diametrul de 7,5 mm și prin deducerea zonelor de inhibiție.

Rezultatele sunt cuprinse în tabelul 2.

Tabelul 2

Specia	Zonele de inhibiție, în mm				
<i>Micrococcus lysodeicticus</i>	12,0	10,0	10,0	9,2	9,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,4	9,5	10,0	10,2	8,8
<i>Sarcina lutea</i>	10,0	12,0	9,2	10,5	11,0
<i>Streptococcus cremoris</i>	9,0	9,2	0	9,5	8,8
<i>Corynebacterium equi</i>	9,0	9,0	9,5	8,0	0
<i>Bacillus licheniformic</i>	10,0	9,0	9,5	8,0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	10,8	12,2	11,8	13,5	11,5
<i>Bacillus albicans</i>	9,0	8,0	9,0	0	8,5
<i>Fusarium solani</i>	8,8	13,0	14,4	10,2	11,0
<i>Aspergillus ochraceus</i>	10,0	12,0	12,5	12,5	12,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11,0	10,0	9,8	9,5	0
<i>Kloeckera apiculata</i>	9,0	12,0	9,5	9,2	0

Testarea concentrației de propolis în alcool etilic s-a efectuat pe *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea* și *Staphylococcus aureus*. Rezultatele sunt redatate în tabelul 3.

Tabelul 3

Specia	Concentrația de propolis în alcool etilic				
	1 : 1	1 : 3	1 : 4	1 : 6	1 : 10
<i>Bacillus subtilis</i>	10,0	10,0	11,0	10,0	9,5
<i>Sarcina lutea</i>	10,0	11,0	10,0	10,0	8,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	10,0	10,0	10,0	9,8	9,8

Pentru determinarea posibilității unei mai bune difuziuni a propolisului dizolvat în alcool etilic, după adăugarea de apă, s-au făcut experiențe pe *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium equi* și *Sarcina lutea*. La 9 ml soluție de propolis în alcool etilic (raport 1 : 3) s-a adăugat 1 ml apă distilată. Rezultatele sunt ilustrate în tabelul 4.

Tabelul 4

Specia	Zona de inhibiție, în mm			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10,8	10,8	11,0	11,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	10,0	10,0	10,2	9,5
<i>Corynebacterium equi</i>	10,5	10,0	10,8	10,5
<i>Sarcina lutea</i>	10,5	9,8	10,0	10,8

Termostabilitatea propolisului a fost experimentată prin încălzirea propolisului dizolvat în alcool etilic (1 : 3) pe o baie de apă, în patru eprubete, încălzite la temperatura de 40°C, 60°C, 80°C și respectiv 100°C. Încălzirea a durat trei minute. Rezultatele pot fi consultate în tabelul 5.

Tabelul 5

Specie	Temperatura, °C			
	40	60	80	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	10,0	10,0	9,0	9,5
<i>Sarcina lutea</i>	11,0	12,0	11,0	

### Partea a III-a

În această parte a lucrării se stabilește efectul relativ al propolisului, comparativ cu unele antibiotice. Pentru penicilină și propolis a fost utilizat ca microorganism de testare *Staphylococcus aureus*. Rezultatul a fost negativ, probabil a fost testată o sușă rezistentă. Propolisul a creat zone de inhibiție, dar penicilina nu. De aceea, s-a folosit *Bacillus subtilis*.

Experiența s-a efectuat pe o placă de dimensiuni mai mari, cu endoagar în care cultura de microorganisme cultivate în bulion a fost reînsămînată. Pe endoagar au fost plasate 7 role cu propolis dizolvat în alcool etilic (raport 1 : 3) și penicilină 16, 8, 4 u. Cultura a fost ținută în termostat la 37°C. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 6.

Tabelul 6

Substanță utilizată	Zonele de inhibiție, în mm					
	12,2	14,0	13,5	14,0	12,5	12,5
Propolis alcool etilic	12,2	14,0	13,5	14,0	12,5	12,8
Penicilină 16 u.	12,2	12,4	12,3	12,4	12,6	12,5

La stabilirea acțiunii propolisului în comparație cu acțiunea fungicidinei a fost utilizată levura *Saccharomyces cerevisiae* ca microorganism pentru testare. Concentrația propolisului în alcool etilic a fost de 1 : 3 ; fungicidina — 100 u, 50 u și 25 u. Rezultatele sunt arătate în tabelul 7.

Tabelul 7

Substanță utilizată	Zona de inhibiție, în mm			
	12,2	12,6	12,5	12,4
Propolis : alcool etilic	12,2	12,6	12,5	12,4
Fungicidină 100 u.	20,0	20,0		
"      50 u.	17,3	17,0		
"      25 u.	12,5	12,5		

## **Rezultate și discuții**

În lucrare am intenționat să subliniem efectele antimicrobiene ale propolisului asupra unor specii de microorganisme. Acțiunea sa antimicbiană a fost demonstrată de un mare număr de autori. LINDENFELSER consideră că au fost evidențiate efectele generale bacteriostactice și fungistatiche, mai ales la bactériile grampozitive. Propolisul nu a acționat asupra nici uneia dintre cele două culturi de drojdii testate.

Din experiențele efectuate rezultă că propolisul acționează cu efect antibiotic asupra majorității microorganismelor testate, mai ales asupra coccilor grampozitivi — *Micrococcus lysodeicticus*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, asupra bacililor gramnegativi — *Bacillus subtilis*, — *Corynebacterium equi*, precum și asupra unor specii de mucegaiuri — *Aspergillus ochraceus* și a unor drojdii — *Saccharomyces cerevisiae*.

Diferitele concentrații de propolis în alcool etilic nu au prezentat diferențieri esențiale — pînă la concentrația de 1 : 10, care a prezentat eficiența cea mai redusă.

Nu am observat vreo diferență între efectul propolisului dizolvat în alcool etilic și cel al propolisului în soluție de alcool etilic cu adăos de apă.

Din seria de experiențe efectuate cu scopul de a testa termostabilitatea propolisului nu am sesizat diferențieri semnificative. Putem presupune că propolisul este o substanță termostabilă. Această calitate a fost, de altfel, evidențiată și de KIVALKINA.

Efectul antibiotic relativ al propolisului corespunde valorii a 16 u penicilină și 25 u fungicidină.

Trebuie să remarcăm că rezultatele testelor efectuate au putut fi influențate — și anume mai degrabă în sens negativ — de una din calitățile propolisului însuși și anume de solubilitatea sa mai mare în alcool decît în apă. Pe de altă parte, suntem de părere că, deși s-a evitat relativ eficient evaporarea alcoolului etilic din role (prin faptul că jumătatea superioară a plăcii Petri se sprijinea direct pe role). acest proces de evaporare a putut totuși avea loc, prin difuzarea soluției în mediul solid. Tot astfel putem explica efectul negativ înregistrat la testarea alcoolului etilic ca atare asupra speciilor de microorganisme pe care s-a experimentat. În mod analog, metodele de titrare nu au putut fi exploatați la maximum de precizie, deoarece și o concentrație infimă de alcool etilic în mediile de cultură lichidă are efect antimicrobian.

Au fost formulate, cu prilejul acestor experiențe, numeroase întrebări, al căror răspuns va fi dat, fără îndoială, de experiențe ulterioare. În viitor, avem intenția să ne orientăm asupra testării acțiunii propolisului față de o cît mai largă porțiune a spectrului microbial, în scopul investigării acestei substanțe din punct de vedere farmacologic.

Suntem încredințați că discuțiile pe această temă și eventuala colaborare în direcția semnalată săint de natură să releve pe deplin calitățile acestui interesant produs biologic.

# ACȚIUNEA PROPOLISULUI ASUPRA VIRUSULUI HERPETIC „IN VITRO“

I. CRĂIAN, A. MUȚIU, N. ȘAHNAZAROV, V. CIOCA,  
V. EȘANU, A. POPESCU\*  
ROMANIA

## Introducere

În ultimul deceniu, din ce în ce mai multe eforturi de cercetare au fost consacrate aprofundării multiplelor aspecte legate de acțiunea terapeutică a unor produse apicole.

Dintre acestea propolisul a făcut obiectul a numeroase studii experimentale și clinice, o atenție deosebită fiind acordată proprietăților tale „in vitro“ cu virus *Herpes simplex*.

Rezultatele pozitive semnalate de unii autori (4, 6) privind efectele inhibitorii ale extractelor de propolis asupra unor infecții experimentale cu unele virusuri vegetale (virusul mozaicului castravetelui, virusul pătării tutunului, virusul necrozei tutunului), și animale (virusul gripal) au deschis perspectiva testării acțiunii propolisului și asupra altor grupe de virusuri.

În această lucrare prezentăm unele date preliminare obținute prin testarea acțiunii unor extracte de propolis asupra infecției experimentale „in vitro“ cu virus *Herpes simplex*.

## Material și metodă

A. Virus. S-a utilizat tulpina VR3 de virus *Herpes simplex* (VSH) (de tip 1, 5) întreținută prin treceri succesive pe linii celulare simiene și de iepure.

Cultiuri celulare. Experimentul a fost realizat pe celule de embrion uman total (EU) la pasajul 11—15 *in vitro*.

Mediul de cultură. Ca mediu de creștere s-a folosit IC—65 cu 10% ser de vițel; mediul de întreținere a fost reprezentat de IC—65 fără ser de vițel.

Pentru testarea formării de plaje sub agar s-a utilizat mediul cu următoarea compoziție: soluție Earle 53%, soluție hidrolizat de lactalbumină 40%, ser de vițel 5%, glutamină 2%, penicilină 200 v. i/ml, streptomycină 100 g/m, agar 3% — 100 ml.

Propolis. Propolisul brut a fost obținut de la Combinatul Apicol București. În testare a fost folosit propolisul adus într-o formă tolerabilă pentru culturile celulare, în concentrație mai mică de 1%.

Toxicitatea produsului a fost testată pe culturi celulare de embrion uman prin încorporarea în mediu de cultură a produsului în diferite diluții și menținerea lui timp de 7 zile. Doza maximă tolerată a fost considerată acea diluție care nu produce modificări de creștere și morfologie celulară, utilizându-se experimental diluția de 1/20.

\*) Asistență tehnică: Cetățian M., Nica M., Dumoni M.

B. 1. *Testarea acțiunii virulicide a extractului de propolis asupra VHS prin amestec extemporaneu.* Lichidul de cultură al celulelor infecțate cu VHS conținând  $10^6$  DI<sub>43</sub>/0,1 ml în amestec cu extract de propolis diluat 1/20 a fost menținut la 37°C, 24 de ore, efectuindu-se titrarea infectivității pe EU la diferite intervale de timp.

2. *Testarea acțiunii antivirale a produsului a fost efectuată prin :*

— *metoda titrărilor comparative în tuburi cu și fără produsul incorporat în mediul de cultură.* Pentru aprecierea efectului reducerii titrului infectat (DL<sub>43</sub>) culturile au fost inoculate în diluții zecimale, lăsate 2 ore la absorbție și apoi adăugat mediul de întreținere cu și fără propolis și menținute timp de 7 zile, interval în care a fost urmărită apariția efectului citopatic. Titrul infectant a fost calculat după metoda Spearman-Kärber și exprimat în DI<sub>43</sub>.

— *metoda plajelor cu și fără încorporarea produsului în agar.* Aprecierea reducerii titrului infectant exprimat prin numărul unităților formatoare de plaje (UFP) s-a făcut prin comparare cu valorile obținute la titrarea-martor, semnificația statistică a valorilor fiind stabilită cu ajutorul tabelelor Lorentz (8). Pentru aceasta, culturi de celule în flacoane Povitzki, după îndepărțarea mediului au fost spălate de 2 ori cu PBS, inoculate cu 1 ml suspensie virală în diluții zecimale. Loturile de cîte 4 flacoane per diluție au fost menținute pentru absorbție 2 ore, spălate de două ori cu PBS și acoperite cu agar cu mediu nutritiv cu și fără propolis. Culturile menținute timp de 6 zile la 37°C au fost acoperite cu soluție de roșu neutru 1/10000 pentru numărarea plajelor. Culturile au fost fixate cu formol 10% timp de 4 ore apoi colorate cu soluție Giemsa.

3. *Aprecierea acțiunii propolisului asupra curbei de creștere a titrului infectant al VSH în culturile celulare :* culturile au fost inoculate cu aproximativ 5000 DI<sub>43</sub> VHS, lăsate 2 ore la absorție, spălate de două ori cu PBS și adăugat mediul de întreținere cu și fără propolis. Culturile au fost menținute cu acest mediu timp de 0, 3, 12, 20, 24 ore. Pentru fiecare variantă la intervalele de timp specificate, mediul cu propolis a fost înlocuit cu mediul de întreținere după 2 spălături cu PBS și au fost efectuate titrări la toate aceste intervale. În acest scop, au fost sacrificate cîte 4 tuburi, supuse la două cicluri îngheț-dezgheț și apoi centrifugate la 3000 r/min. timp de 20 minute ; supernatantul cumulat a fost titrat pe culturi de E.U. Titrurile infectante (DI<sub>43</sub>) au fost comparate cu titrurile obținute de la culturile martor netratate cu propolis.

4. *Testarea acțiunii extractului de propolis asupra fractiunii celulare și extracelulare a VHS în culturile de celule :* culturi celulare de EU infectate cu  $10^5$  DI<sub>43</sub> VSH cu și fără propolis încorporat în mediu au fost menținute la 37° timp de 24 ore, după care mediul de cultură a fost îndepărtat constituind fractiunea extracelulară de VSH ; monostrustrul celular a fost spălat de 2 ori cu PBS și supus la două cicluri îngheț-dezgheț după care a fost reluat în soluție IC<sub>65</sub> și centrifugat 20 min. la 3000 r/min., supernatantul constituind fractiunea celulară de VHS.

Din fracțiunile celulară și extracelulară s-au efectuat titrările infectivității VHS.

Pentru aprecierea relației doză-efect au fost efectuate titrări comparative în absență și prezență propolisului în mediu în diferite diluții, urmărindu-se titrul infectant la 48 ore și la 72 ore.

Conservarea în timp a proprietăților antivirale a extractului de propolis a fost apreciată prin testarea activității unui extract de propolis la diferite intervale de la preparare, soluția fiind menținută la +4°C timp de 3 luni.

## Rezultate

a) *Aceiunea antivirală a extractului de propolis asupra VHS în prim amestec extemporaneu.*

Rezultatele obținute prin testarea acțiunii virulicide a extractului de propolis asupra VHS arată o scădere apreciabilă a titrului infectat comparativ cu martorul la 24 ore după menținerea în amestec.

b) *Influența extractelor de propolis asupra titrului infectat de VHS.*

În tabelul nr. 1 sunt redate rezultatele obținute prin titrări comparative ale infectivității VHS pe culturi celulare de EU cu și fără propolis incorporat în mediul de cultură. Au fost testate 2 extracte de propolis notate de noi cu I și II obținându-se o reducere semnificativă

a titrului infectant  $\left( \log \frac{V_0}{V} \right)$

*Tabelul 1*

### **Influența extractelor de propolis asupra titrului infectant al virusului *Herpex simplex***

	Titrare martor $V_0$ )	Titrare martor $V_0$ )	Rd $\left( \log \frac{V_0}{V} \right)$
Extract propolis I	$10^{1,75}DI_{43}$	$10_5DI_{43}$	3,25
Extract propolis II	$10^2DI_{43}$	$10^6DI_{43}$	4

*Tabelul 2*

### **Influența extractului de propolis asupra numărului plajelor**

Martor titru U.F.P./ml	Extract propolis Titru U.F.P./ml	Rd. titru U.F.P./ml
2,10 <sup>7</sup>	7,5,10 <sup>6</sup>	64%

În tabelul nr. 2 sunt prezentate rezultatele obținute prin metoda reducției plajelor sub agar. Reducția de 64% a unităților formatoare de plaje (U.F.P.) este considerată semnificativă la un prag de 5% eroare potrivit tabelelor Lorentz (8).

c) *Acțiunea extractului de propolis asupra curbei de creștere a titrului infectant de VHS în culturi celulare.*

Se constată curbe de creștere a titrului infectat al VHS în culturi celulare menținute sub acțiunea propolisului la diferite intervale de timp de la inoculare (6 ore pînă la 24 ore).

Se constată că, sub acțiunea propolisului menținut în mediul de cultură timp de 16, 20, 24 ore, multiplicarea VSH se produce la un nivel scăzut, obținindu-se o diferență marcantă față de curba mărtorului nefratrat.

La variantele în care culturile au fost tratate pe o durată mai scurtă de timp de la inocularea VHS, după îndepărțarea propolisului, ciclul de multiplicare se reia, diferențele la sfîrșitul experienței nefiind semnificative față de martori.

Sînt redate rezultatele obținute prin testarea acțiunii extractului de propolis asupra producției de VHS prin titrarea infectivității fractiunilor celulare și extracelulare.

Se constată la 24 ore de la inoculare inactivarea VHS în mediul de cultură (acțiunea extracelulară) și o scădere semnificativă a producției celulare de VHS (acțiunea celulară).

*Tabelul 3*

**Testarea relației doză-efect**

Timp titrare	M (V <sub>0</sub> )	diluția 1/100	diluția 1/80	diluția 1/40	diluția 1/20
48 h	10 <sup>5</sup>	,10 <sup>4,5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	1,50
Rd*		0	0,50	1,00	10 <sup>3,5</sup>
72 h	10 <sup>5,75</sup>	10 <sup>5,75</sup>	10 <sup>5,25</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4,25</sup>
Rd		0	0,50	0,75	1,50

\* Rd, exprimat în  $\left( \log \frac{V_0}{V} \right)$

d) *Testarea relației doză-efect*

Tabelul nr. 3 cuprinde analiza relației dintre concentrația propolisului în mediu de cultură și efectele inhibitorii asupra titrului infectant de VHS. Se constată pierderea activității inhibitorii de la diluția 1/80.

e) *Testarea conservării acțiunii antivirale a extractului de propolis*

În tabelul nr. 4 sunt consemnate rezultatele obținute prin testarea unui extract de propolis menținut timp de 3 luni la +4°C. Proprietățile antivirale ale extractului de propolis rămân nemodificate după o lună. La sfîrșitul perioadei de 3 luni se constată însă o marcantă scădere a acestor proprietăți. Astfel se menține o activitate antivirală redusă constatată printr-o capacitate de reducție a titrului infectant al VHS numai la 48 ore și 72 ore.

*Tabelul 4*

**Testarea conservării în timp a acțiunii antivirale a extractului de propolis**

data testării produsului de la preparare	ore de la inooulare	Reducerea titru infectant ( $\log \frac{V_0}{V}$ )			
		48 h	72 h	96 h	168 h
7 zile		NT	2	NT	3,25
1 lună		3	2,5	3,25	3,75
3 luni		1,25	1,25	1,75	0,25

### Discuții

Rezultatele obținute în condițiile noastre experimentale susțin existența unei activități antivirale semnificative a extractului de propolis asupra infecției cu VHS „in vitro“. Acțiunea propolisului se manifestă printr-o scădere a titrului infectant al VHS atât printr-o acțiune virulicidă cît și prin efecte inhibitorii asupra multiplicării VSH. Multiplicarea VSH se menține la un nivel scăzut, restabilindu-se după îndepărțarea propolisului din mediu.

Proprietățile antivirale se evidențiază prin utilizarea în testare a extractului de propolis pe un interval limitat de timp de la preparare. După o conservare mai îndelungată acțiunea inhibitorie asupra VSH este mult diminuată.

Cercetări în curs sunt menite să clarifice modul de acțiune al extractului de propolis asupra infecției experimentale cu VHS, pentru a lămuri dacă efectele inhibitorii se exercită direct asupra virionilor sau prin interferență cu metabolismul celular.

În modul de interpretare și comparare a datelor consemnate trebuie avut în vedere că utilizarea în aceste modele experimentale a unui produs natural a cărui compoziție este parțial cunoscută impune exi-

gențe legate de aspectele de standardizare a activității specifice, a testării efectelor toxice asupra sistemului celular, a conservabilității proprietăților etc.

Aceste dificultăți vor putea fi îndepărtate prin utilizarea în experiment a unor fracțiuni cu compoziție cunoscută izolate din produsul brut.

Ne exprimă mpărerea că propolisul acționează nespecific, stimulind capacitatea celulară de apărare. De altfel în țara noastră, în Iugoslavia și în alte țări, pe baza unor cercetări experimentale, s-a emis părerea că este posibil ca propolisul să inducă formarea de interferon.

## OBSERVAȚII ASUPRA EFECTULUI ANTIBIOTIC AL PROPOLISULUI, POLENULUI ȘI MIERII

A. GRECEANU, V. ENCIU  
ROMÂNIA

Efectul bactericid al produselor apicole este cunoscut de mult timp. Cercetări făcute în ultimul timp au demonstrat activitatea inhibitorie a extractelor obținute prin diverse metode din produsele apicole, precum și activitatea antimicrobiană în tratamentul unor afecțiuni chirurgicale, dermatologice și oftalmologice.

În nota de față prezentăm observațiile noastre făcute pe tulpi microbiene de origine animală efectuate printr-o metodologie inedită.

### Material și metodă

Polenul și mierea au fost folosite ca atare, iar pentru propolis am folosit metoda de extragere la cald cu alcool etilic de 96°.

a. — Extragerea la cald — 6 g propolis + 20 ml ser fiziologic încălzit timp de o oră la 80°C.

b. — Extragerea cu alcool etilic de 96°C — 5 g propolis plus 20 ml alcool timp de 24 ore la temperatura camerei.

### Metoda de lucru

Pentru toate produsele apicole testate s-a utilizat agarul obișnuit pe plăci Petri cu diametrul de 10 cm. În grosimea agarului care a fost de 6 mm s-au practicat 4 godeuri, în fundul godeului punându-se un strat subțire de geloză pentru a împiedica difuzarea produselor sub stratul de agar.

Tabelul 1

## Comportarea unor tulpini microbiene de origine animală față de propolis

Nr. crt.	Tulpina testată	Metoda de extragere la căld. 80°C	Metoda de extragere cu alcool etilic 96°C	Penicilina 0,4 U.I./godeu	Rezultate
1.	<i>Staphylococcus aureus</i> Ox.	1,2 cm	1,7 cm	1,5 cm	sensibil
2.	<i>B. coli</i> (O <sub>5</sub> )	—	—	—	rezistent
3.	<i>Salmonella</i> B	0,8 cm	1 cm	—	sensibil
4.	<i>Salmonella</i> D	1,3 cm	1,1 cm	—	sensibil
5.	<i>Pasteurella avium</i>	1 cm	1,1 cm	—	sensibil
6.	<i>Proteus</i> Sp.	1 cm	1,2 cm	—	sensibil
7.	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,2 cm	1,1 cm	—	sensibil
8.	<i>B. antracis</i>	1,1 cm	1,3 cm	—	sensibil
9.	<i>B. cereus</i>	1 cm	1,1 cm	—	sensibil
10.	<i>Cl. tetani</i>	la diluția 1/14 extract apos în geloză Veillon pozitiv		—	rezistent
11.	<i>Cl. perfringens</i> tip B	nu crește la diluția 1/14 extract apos în geloză Veillon		pozitiv	sensibil

Tabelul 2

## Comportarea unor tulpini microbiene de origine animală față de polen

Nr. crt.	Tulpina testată	Zona de inhibiție	Rezultat
1.	<i>Staphylococcus aureus</i> Ox.	0,6 cm	moderat sensibil
2.	<i>Bacillus antracis</i>	0,6 cm	moderat sensibil
3.	<i>Bacillus coli</i> O <sub>5</sub>	1,5 cm	moderat sensibil
4.	<i>Salmonella</i> D	1,2 cm	sensibil
5.	<i>Salmonella</i> B	1,3 cm	sensibil
6.	<i>B. cereus</i>	—	sensibil
7.	<i>Listeria monocytogenes</i>	—	rezistent

— Pentru propolis — în fiecare godeu s-au pus 3 picături de extract, testarea s-a făcut comparativ cu penicilina 0,4 U.I./godeu.

— Pentru polen — în fiecare godeu s-au pus 10 granule de polen.

— Pentru miere — în fiecare godeu s-au pus 3 picături de miere. Citirea s-a făcut după 24 de ore utilizând metodica folosită în difuzimetria radială de la antibiogramă.

Din analiza datelor s-a observat că toate tulpinile testate, cu excepția lui *E. coli* și *el. tetani* sunt sensibile față de extractul apos și alcoolic.

În general extractul alcoolic este mai activ față de extractul apos, fapt pe care îl atribuim potențării efectului antibiotic al propolisului de către alcool. În plus ca observație am constatat că în timp ce la *Staphylococcus*, dar mai ales la *Bacillus antracis* în zona de inhibiție a penicilinelui s-au constatat colonii rezistente, pentru propolis zonele sunt clare fără apariția mutantelor rezistente.

Din analiza rezultatelor obținute cu polen se observă că toate tulpinile testate cu excepția lui *B. cereus* și *Listeria monocytogenes* sunt sensibile și moderat sensibile.

În ceea ce privește mierea s-a observat că toate tulpinile testate cu excepția lui *B. cereus* și *Listeria monocytogenes* sunt sensibile. În plus ca o observație am constatat apariția a două zone de inhibiție, prima zonă este clară iar în a doua zonă apar mutante rezistente.

Întenționăm ca în viitor să facem o testare pe mai multe specii bacteriene și să facem observații asupra activității antimicrobiene a produselor apicole *in vivo*, într-o primă etapă pe animale de laborator.

Dacă rezultatele vor fi încurajatoare vom încerca o introducere în clinică și în special în afecțiuni de ordin chirurgical.

## Concluzii

1. S-au preparat extracte din propolis prin metoda extrageriei la cald în ser fizologic și cu alcool etilic de 96°, mierea și polenul sunt folosit ca atare.

2. Extractele din propolis sunt testat pe germenii aerobi și anaerobi, mierea și polenul sunt testat față de germenii aerobi.

3. În metoda de testare a extractelor de propolis s-a luat ca temă de comparație penicilina 0,4 U.I./godeu.

Tabelul 3

### Comportarea unor tulpini de origine animală față de miere

Nr. crt.	Tulpina testată	Zona de inhibiție la miere	Rezultatul
1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	1 cm	sensibil
2.	<i>B. antracis</i>	0,9 cm	sensibil
3.	<i>Salmonella D</i>	2 cm	sensibil
4.	<i>Salmonella B</i>	2 cm	sensibil
5.	<i>B. coli</i>	3 cm	sensibil
6.	<i>B. cereus</i>	—	rezistent
7.	<i>Listeria monocytogenes</i>	—	rezistent

4. La testări, utilizând ca metodă de citire zona de inhibiție din jurul godeului după criteriile difuzimetriei radiale, s-a constatat sensibilitatea următorilor germenii :

— la propolis, genul : *Staphylococcus*, *Salmonella*, *proteus*, *Pasteurella*, *Listeria*, *B. antracis*, *B. cereus*, *B. perfringens* ;

— la polen, genul *Staphylococcus*, *Salmonela*, *E. coli*, *B. antracis* ;

— la miere, genul *Staphylococcus*, *B. antracis*, *Salmonella* și *E. coli*.

5. Extractele din propolis nu sunt active față de *E. coli* și nici față de *Cl. tetani*.

Polenul și mierea nu sunt active față de *B. cereus* și *E. coli*.

#### B I B L I O G R A F I E

—*Propolisul* — Ed. APIMONDIA, București, 1975, 1978.

MARIN M., AL. POPA, N. POPESCU, M. ȘERBAN, A. ȘUTEU — *Valoarea dietetică alimentară și terapeutică a produselor apicole*.

#### CERCETĂRI PRIVIND ACȚIUNEA PROPOLISULUI ȘI PĂSTURII ÎN INFECȚIA GRIPALĂ EXPERIMENTALĂ

V. JUCU, T. GİDOIU, Rodica BABII, Elena PALOŞ

ROMÂNIA

În afara de acțiunea antimicrobiană bine cunoscută în ultimii ani, au fost comunicate cercetări despre acțiunea antivirală a propolisului.

În experiențele întreprinse am încercat să scoatem în evidență acțiunea antivirală, sau mai bine-zis acțiunea protectoare a propolisului și a păsturii față de infecția virală (gripală) experimentală la șoareci. Deși primele rezultate sunt incurajatoare, ele sunt încă insuficiente pentru concluzii definitive atât sub raportul dimensiunii experiențelor, cât și în ce privește răspunsul legat de doza optimă, calea de administrare, momentul administrării.

Experiențele noastre au urmărit 3 direcții :

1) Protecția șoareciilor prin administrarea totală pe cale intranazală și intraperitoneală a suspensiilor de propolis și păstură, înainte de a fi supuși infecției gripale (acțiune preventivă).

2) Administrarea de propolis cu păstură la 24 ore după infecția gripală (animalele nu prezintă modificări clinice) urmată de 3 mici administrări zilnice.

3) Punerea în evidență de inhibitori virali în sensul șoareciilor care au fost inoculați intraperitoneal cu suspensiile de propolis și păstură.

În experimentul nostru am folosit ca substanțe cu acțiune antivirală propolisul și păstura. Pentru solvarea celor 2 substanțe am folosit o soluție de 10% de dimetil-sulfoxid (firma Suchard).

Din datele de literatură, DMSO în concentrație de 70% nu este toxic pentru om și animale, mărește permeabilitatea țesutului și este bun vehicul pentru diferite substanțe medicamentoase.

Un gram din fiecare substanță s-a dizolvat în 10 ml DMSO obținându-se în cazul propolisului o soluție maron-închisă, iar în cazul păsturei o soluție galbenă cu un ușor sediment. S-a completat pînă la 100 ml cu tampon fosfat pH 7,2. Preparatul din propolis se prezinta ca o suspensie lacterescentă, opacă care sedimentează greu, iar preparatul din păstură ca o suspensie lacterescentă mai transparentă care în repaus depune un sediment. Suspensiile au fost păstrate la +4°C, iar înainte de folosire se agită pînă devin omogene.

Pentru infecția de control s-a folosit virusul gripal APR<sub>8</sub> cu un titru DL<sub>50</sub> intranasal la șoareci albi de 16—18 g.

Suspensia de propolis de 1 g la 100 ml DMSO 10% nu era toxică pentru șoareci, deși în unele experimente în care s-a folosit un ml de suspensie intraperitoneal s-a observat o mortalitate de 30%. Dozele mai mici au fost bine tolerate de șoareci. Suspensiile de păstură au fost și mai bine tolerate, neînregistrindu-se pierderi mici la administrarea de 1 ml intraperitoneal.

## Rezultate

Administrarea intranasală a suspensiilor de păstură și propolis s-a făcut în diluții mai mari (1/250) întrucât suspensiile 1/100 produceau obstrucția căilor respiratorii la șoareci. La intervale de 1, 3 și 5 zile s-a practicat infecția de control cu virus gripal APR<sub>8</sub> în diluții de 10 DL<sub>50</sub> și 100 DL<sub>50</sub>.

Nu s-au observat deosebiri evidente între șoareci din lotul martor nefratat și cei care au fost tratați cu suspensiile de păstură și propolis. În acest caz este necesar de menționat că și cantitatea de substanță activă era mică, mai puțin de 0,5 mg/șoarece. Suspensiile de păstură și propolis s-au administrat intraperitoneal în cantități de 0,2, 0,6 și 1 ml iar la interval de una și săpte zile animalele au fost supuse infecției de control cu virus gripal APR<sub>8</sub> în diluții de 10 DL<sub>50</sub> și 100 DL<sub>50</sub>. Procentul de supraviețuire cel mai ridicat s-a înregistrat în cazul șoarecilor care au fost tratați cu 0,6 ml intraperitoneal, iar infecția de control s-a făcut la 7 zile după administrarea de păstură și propolis (tabelul 1).

Șoareci au fost infectați cu 10 DL<sub>50</sub> viruși gripali, APR<sub>8</sub>, iar după 24 ore s-au făcut 3 inoculații intraperitoneale la interval de o zi 0,2 și 0,4 ml, iar pe alt lot de șoareci 3 administrări per os de 0,5 ml cu suspensiile de păstură și propolis. Cel mai mare procent de supraviețuire s-a constatat la șoareci care au fost tratați 3 zile cu 0,4 ml suspensie intraperitoneală.

Cite un lot de 10 șoareci au fost inoculați intraperitoneal cu 1 ml din suspensiile de păstură și propolis. La 5 zile după inoculare s-a re-

**ACTIONEA SUSPENSILOR DE PROPOLIS ÎNAINTE DE INFECȚIA GRIPALĂ**

Produs	Cantitatea în ml	Intervalul la care s-a administrat vir. de control	Mortorii neinfectați, de supra- viețuire	% animale care au supraviețuit la infecția de control	
				10 DL <sub>50</sub>	100 DL <sub>50</sub>
V. Grp. P.R. 8	3 pic. intranasal	—	—	10	0
DMSO 10%	1	—	100	—	—
DMSO 10%	1	24 h	—	100	100
Suspensie de păstură	0,2	24 h	100	20	—
	1	24 h	100	30	10
	0,6	7 zile	100	50	50
Suspensie de propolis	0,2	24 h	100	10	—
	1	24 h	70	30	0
	0,6	7	100	50	30

coltat singele, iar serul rezultat a fost testat pentru prezența de inhibitori viralii față de o infecție cu virus gripal APR<sub>8</sub>. Înainte de folosire serurile au fost ținute la 50°C. În tabelul 2 se arată procentul de animale care au supraviețuit infecției cu 10 DL<sub>50</sub> și care cu 24 ore înainte

**ACTIONEA SUSPENSILOR DE PĂSTURĂ ȘI PROPOLIS DUPĂ INFECȚIA GRIPALĂ**

Produs	Cantitatea în ml	Calea de admin.	% animale care au supraviețuit infecției cu 10 DL <sub>50</sub>
Vir. gripal	3 pic. intranasal	I.N.	20
Suspensie de păstură	0,2	I.P.	50
	0,4	I.P.	70
	0,5	per os	40
Suspensie de propolis	0,2	I.P.	50
	0,4	I.P.	50
	0,5	per os	60

au primit intranasal ser de șoareci provenit de la șoareci inoculați cu suspensiile de păstură și propolis.

Din acțiunea acelorași preparate administrate două zile intranasal și intraperitoneal, începînd cu 24 ore după infecția șoarecilor cu  $10 \text{ DL}_{50}$  și virus gripal APR<sub>8</sub>, rezultă evident că șoareci care au fost tratați 2 zile după infecția pe cale intraperitoneală au prezentat procentul cel mai mare de supraviețuire.

### Discuții

Suspensiile 1% de propolis și păstură 10% în DMSO sunt bine tolerate de șoareci pe cale intraperitoneală și orală. Administrarea intranasală este mai dificilă, datorită viscozității suspensiilor. S-ar putea încerca alți solvenți sau să se crească proporția de DMSO. Administrarea pe cale intraperitoneală a suspensiilor asigură un procent de supraviețuire mai mare cînd infecția de control s-a efectuat la 7 zile interval, și mult mai scăzut dacă șoareci se infectează la o zi după ce au primit suspensiile de propolis și păstură. Șoareci infectați cu virusi gri-pali APR<sub>8</sub> ( $10 \text{ DL}_{50}$ ), iar după o zi tratați timp de 3 zile intraperitoneal și per os cu suspensiile de păstură și propolis prezintă un procent de supraviețuire evident față de lotul martor nefratat.

Serurile sanguine provenite de la șoareci inoculați intraperitoneal cu propolis și păstură asigură un procent de supraviețuire ridicat față de infecția de control cu  $10 \text{ DL}_{50}$  virusi gri-pali APR<sub>8</sub>, sugerînd astfel ideea că aceste substanțe ar putea induce inhibitori viralii după mecanismul de acțiune al interferonului. Pentru demonstrarea acestui lucru sunt necesare cercetări care să ducă la folosirea acestor substanțe și la asigurarea acțiunilor antivirale atât pe animale cât și pe culturi de celule. Cercetările noastre fiind însă în curs, probabil că unele din rezultatele prezentate aici vor fi modificate în sensul unor precizări și în special interpretări statistice.

### BIBLIOGRAFIE

ALEXANDROV I. S., L. N. DANITOV — *Însușirile antimicrobiene ale propolisului.*

BOJNANSKY V., V. KOSLJAROVA — Efectele inhibitorii ale propolisului asupra unor virusuri ale plantelor. *Propolis*, Ed. APIMONDIA, București, 1978, p. 64.

DEREVICI A., AL. POPESCU, N. POPESCU — Considerații asupra extractului de propolis, sinteza lucrărilor apărute între anii 1964—72, *Propolis*, Ed. APIMONDIA, Buc.

KOCH H. G. — Sur une préparation de DMSO. *Medicamentum* 32 Berlin, RDA  
VECHET L. — Efectele propolisului asupra unor specii de microorganisme și mucegaiuri. *Propolis*, Ed. APIMONDIA, București, 1978, p. 59.

# UTILIZAREA SPRAYULUI DE PROPOLIS ÎN TRATAMENTUL ARSURILOR EXPERIMENTALE LA COBAI

E. MUREŞAN, M. GABOREANU, A. I. BABA, O. ROTARU  
ROMÂNIA

În ultimii ani a avut loc o reactualizare și concomitent o reconsiderare a propolisoterapiei. Aplicarea diferitelor forme farmaceutice cu propolis în tratamentul unor afecțiuni și leziuni cutanate a beneficiat în continuare de o atenție deosebită. Precizările aduse de numeroși cercetători referitoare la efectele bacteriostatiche, antifungice, anestezice, cicatrizante etc. ale propolisului au îndreptat utilizarea sa în tratamentul arsurilor cutanate. Rezultatele comunicate de N. I. ATIASOV și colab. (1962—1970), ca rod al unei experiențe de 10 ani în tratamentul arsurilor cu unguent cu propolis, sînt concludente și încurajatoare.

Ne-am propus să căutăm și să experimentăm un mod ușor și expeditiv de aplicare a propolisului în arsuri, cercetîndu-i eficiența astfel prin observarea simptomelor locale, cît și cu ajutorul biopsiilor.

## Material și metodă

Experiența s-a efectuat pe 20 de cobai, de vîrstă și greutate egală. Părul din regiunea flancului drept a fost îndepărtat cu ajutorul unui unguent depilator. După o narcoză superficială s-a produs în zona respectivă o arsură cu dimensiunile de 5/5 cm cu ajutorul unui electrotermocauter. Durata aplicării acestuia a fost riguros egală la toți individui, aşa că în final s-a instituit simptomatologia locală a unei arsuri intermediare (după clasificarea lui I. CHIRICUȚA și colab.). La 10 cobai (lotul martor) tratamentul a constat din aplicări zilnice de unguent pe bază de penicilină și sulfatiazol. Restul de 10 cobai (lotul experimental) au fost tratați prin pulverizări zilnice cu o soluție alcoolică 10% de propolis, îmbuteliată sub presiune în flacoane metalice („Spray“). După 6 și respectiv 12 zile de la producerea arsurii au fost recoltate probe bioptrice de la două cazuri din fiecare lot, probe ce au fost prelucrate apoi prin tehnica histologică uzuală.

## Rezultate

La scurt timp după producerea arsurii, tegumentul zonei interesate prezenta aspectul unei escare umede, de culoare cafenie-murdară, avînd la periferie o zonă congestivă, edematiată și cu rare vezicule.

După 24 de ore lotul tratat cu propolis prezenta la locul arsurii o crustă coagulată, uscată, iar zona periferică de congestie și edem era mult atenuată. La lotul martor s-a menținut aspectul de necroză umedă, precum și edemul și congestia marginală.

La 6 zile după instituirea tratamentului cobaii tratați cu propolis aveau arsura acoperită cu o crustă fină, uscată, lipsită de semnele infec-

ției. În zonele unde crusta era desprinsă se observau aspectele inițiale ale epitelizării. Numeroși peri fini începeau să apară pe toată suprafața arsurii. Vindecarea s-a instituit „per primam“ după 10—12 zile, prin epitelizare pornită atât de la periferia arsurii cât și de la elementele epiteliale din zona arsă care au scăpat nedistruse de agentul termic. Zonele cicatriciale, unde au apărut, erau reduse ca extindere și neindurate. Starea generală a cobailor din acest lot a fost în general bună, ei comportându-se și alimentându-se obișnuit.

Cobaii din lotul martor au continuat să prezinte și după 6—8 zile o crustă groasă sub care țesuturile se mențin inflamate și edematiate. Eliminarea spontană a crucei a dat la iveauă o plagă granulară, cu numeroși muguri cărnoși, în majoritatea cazurilor suprainfectată. Vindecarea s-a produs după 20—24 zile, prin cicatrizare lentă, prin forță de retracție granulară și epitelizare centripetă. Cicatricele erau groase, indurate, numeroase zone rămînind lipsite de pilozitate. De menționat că animalele din acest lot au prezentat o stare generală alterată, erau abătute, nu se alimentau obișnuit și au slăbit în greutate.

Examenul microscopic al biopsiilor prelevate la 6 zile a relevat la lotul martor o reacție puternică ce constă din aspecte de congestie, infiltrație limfohistocitară și abundență țesutului de granulație. La lotul tratat cu propolis aceste aspecte morfopatologice erau foarte discrete și apăreau deja procesele reparatorii de epitelizare. Biopsiile de la 12 zile după arsură arătau la lotul experimental un proces de vindecare constituit, pe cind la lotul martor persistau țesutul de granulație și aspectele tipice ale infecției.

## Discuții

Rezultatele favorabile ale utilizării propolisului în tratamentul arsurile le artibuiam anumitor proprietăți ale acestuia și anume :

— propolisul acționează cu efect antibiotic asupra a numeroși germeni patogeni (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus viridans*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Proteus vulgaris* etc.) în unele cazuri depășind chiar nivelul de activitate al unor antibiotice ca penicilina, tetraciclina și ampicilina (I. S. ALEXANDROV, L. N. DANILOV, 1975).

— Propolisul are de asemenea evidente activități antifungice, în special față de dermatofiji (V. F. BOLŠAKOVA, 1975).

— La aceste efecte se adaugă acțiunea anestezică locală (T. TAKOFF, 1975), de stimulare a macrofagelor tisulare (I. S. ALEXANDROV, L. N. DANILOV, 1975), de stimulare a imunoreacțiilor nespecifice (G. VELESCU, M. MARIN, 1975), de stimulare a epitelizării plăgilor (J. SUTTA și colab., 1975 ; N. APETROAIEI, E. ILIESCU, 1975).

Nu este de neglijat nici conținutul în microelemente și vitamine al propolisului, cunoscut fiind faptul că vitaminoterapia (vit. C, B<sub>1</sub>, A) ocupă un loc important în tratamentul arsurilor.

În privința formei farmaceutice de utilizare a propolisului în arsuri la animale am optat pentru pulverizări, acestea fiind foarte ușor de

efectuat de către oricine. Pelicula fină de propolis ce rămîne după evaporația alcoolului are și un efect protector și limitează exudarea plasmelor. Înglobarea propolisului în unguento considerăm că are neajunsuri, deoarece nu favorizează drenajul plăgii, ba chiar poate facilita apariția infecției. Din cercetările lui P. LAVIE (1975) reiese că principiile cu calitate antibiotică din propolis sunt termostabile și se conservă mai bine în soluții alcoolice decât în alte forme farmaceutice.

### Concluzii

Pulverizările cu o soluție alcoolică propolis-spray s-au dovedit evident eficace în tratamentul arsurilor experimentale de gravitate intermediară la cobai.

Atribuim acest rezultat faptului că acest mod de aplicare a propolisului ar putea fi cauza regenerării țesutului epitelial și conjunctiv.

Considerăm că utilizarea acestui mod de aplicare a propolisului ar putea fi experimentată alături de ceilalți factori terapeutici uzuali, în arsurile accidentale la om.

## PERSPECTIVELE APLICĂRII TERAPEUTICE A EXTRACTELOR DE PROPOLIS ÎN AFECȚIUNI CAUZATE DE FLAGELATE ȘI LEVURI

M. IALOMIȚEANU

Nadia NICOLAU

V. DAGHIE

ROMANIA

Deoarece o serie de lucrări clinice și experimentale au subliniat acțiunea favorabilă a propolisului asupra unor microorganisme patogene sau condiționat patogene, ne-am propus să verificăm acțiunea acestei substanțe asupra unor tulpieni de levuri patogene și de fungi cu potențial aflatoxinogen. În cazul unor rezultate pozitive ne-am propus să o aplicare terapeutică la nivelul unor cazuri clinice de care dispunem.

### Material și metodă

S-a realizat un extract alcoolic de propolis 20 g % care a fost înglobat în proporție de 1 g% (concentrație finală de propolis în mediu) în mediu de cultură solid Czapek Dox — Agar. Din extractul alcoolic de propolis s-au realizat în continuare diluții în apă distilată care au fost înglobate în proporții de 0,1 și 0,01 g% în același mediu. În mediu de cultură al plăcilor martor (Czapek Dox — Agar) s-a introdus

o soluție alcoolică care a atins concentrația finală de 5 : 0,5 și 0,05 ml alcool %, concentrații corespunzătoare mediului de cultură în care s-a inglobat soluția de propolis.

Plăcile au fost însămîntate cu 4 tulpieni de *Candida albicans* cu test de patogenitate pozitiv precum și cu 4 tulpieni de fungi, verificate în prealabil ca alfatoxinogene (*Penicillium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium*). Plăcile însămîntate au fost menținute la întuneric și la temperatura camerei timp de 7 zile. Interpretarea rezultatelor s-a făcut comparativ cu plăcile martor.

Cazurile clinice (13) pe care le aveam în rezervă erau reprezentate de afecțiuni produse de levuri sau flagelate și care s-au dovedit rebele la orice alte tratamente curente. Aceste 13 cazuri cuprindeau : 6 bolnavi de stomatită cu *Candida albicans* patogenă 4 bolnave de leucoree cauzată de *Candida albicans* și *Trichomonas vaginalis*, 1 bolnavă de leucoree cauzată de *Candida albicans* și 2 bolnave de leucoree cauzată de *Trichomonas vaginalis*.

### **Rezultate și discuții**

Rezultatele de laborator au arătat că o diluție de 5 ml alcool % în mediul de cultură a împiedicat dezvoltarea tuturor tulpienilor însămîntate. În consecință, nu am putut aprecia acțiunea concentrației de 1 g propolis % în mediul de cultură asupra tulpienilor însămîntate care, întocmai ca și la plăcile martor, nu s-au dezvoltat.

Diluțiile finale de 0,5 și 0,05 ml alcool % în mediul de cultură nu au împiedicat la plăcile martor dezvoltarea tulpienilor însămîntate. Concentrațiile de 0,1 și 0,01 g propolis % au oprit complet dezvoltarea celor 4 tulpieni de *Candida albicans*, precum și a tulpienii de *Cladosporium*. Ceilalți fungi (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* și *Penicillium*) nu au fost influențați. (Tabel 1).

**Tabel 1**

#### **Acțiunea propolisului asupra unor levuri și fungi.**

**Determinări *in vitro* față de martor**

Tulpina	Concentrația % a propolisului în mediul de cultură	Martor cu soluție alcoolică 0,05%	Martor cu soluție alcoolică 0,5%
<i>Candida albicans</i>	—	—	+++
<i>Cladosporium</i>	—	—	+++
<i>Aspergillus flavus</i>	+++	+++	+++
<i>Aspergillus niger</i>	+++	+++	+++
<i>Penicillium</i>	+++	+++	+++

— inhibarea dezvoltării culturii  
+++ dezvoltarea culturii.

În fața acestor rezultate am început tratamentul cu extracte de propolis a cazurilor clinice. Cazurile de stomatită au fost tratate prin badijonări cu soluții de propolis iar cele ginecologice cu spălături (soluții de propolis) precum și cu ovule administrate intravaginal conținând aceeași substanță.

După aproximativ 30 zile de tratament toate cazurile au fost vindecate atât prin aspect clinic cât și de laborator.

Menționăm că acțiunea terapeutică s-a manifestat prompt și asupra cazurilor de *Trichomonas vaginalis* (singular sau asociat cu *Candida*). Această acțiune a propolisului asupra flagelatelor nu am putut să o confirmăm prin cercetări „*in vitro*“ din cauza dificultăților de cultivare a lui *Trichomonas vaginalis*.

Considerăm că aceste rezultate justifică continuarea cercetărilor care cu siguranță vor lărgi sfera de aplicații terapeutice a acestui produs insuficient folosit.

## Capitolul IV

### PREPARATE CU PROPOLIS

#### CERCETĂRI ASUPRA UNOR FORME FARMACEUTICE CU PROPOLIS

C. BRĂILEANU, A. GHEORGHIU,  
Ar. POPESCU, Gh. VELESCU  
ROMANIA

Din cercetările de pînă acum, cunoscute nouă, se constată că, pentru tratarea diferitelor boli propolisul se folosește în soluții hidroalcoolice, fără a se indica o tehnică de preparare corespunzătoare și constantă. De asemenea, nici excipientii folosiți la prepararea unguentelor nu dispersează omogen propolisul brut.

Preparatele indicate de literatură nu reprezintă forme farmaceutice cu un conținut bine determinat de substanțe active, aşa încit să se poată urmări mai bine efectul terapeutic. De aceea, în lucrarea de față ne-am propus să stabilim metodele tehnice de preparare, control și conservare ale unor forme farmaceutice cu propolis — tinctură/extract fluid și moale, soluții injectabile și unguente — medicamente cu care să se poată urmări într-adevăr efectul terapeutic. De asemenea, să se poată stabili și domeniile lor de folosire ca medicamente prin cercetări de laborator și chimice. Astfel, am realizat extractul moale de propolis, care ne-a servit atât la prepararea soluției injectabile (formă neîntîlnită în literatură) cât și la prepararea de unguente omogene.

Aceste forme farmaceutice au un conținut definit de extract moale de propolis și se pot folosi în anumite afecțiuni în medicina umană și veterinară.

#### Material și metodă

Ca materie primă am folosit propolisul. Produsul se prezintă ca o substanță plastică, opacă, parfumată, de culoare brun-deschisă, care se topește la peste 80°C. El a fost păstrat în borcane de sticlă, de culoare brună și bine inchise. Pentru prepararea tincturilor și extractelor, propolisul a fost răzuit și trecut prin sita III și II.

## Prepararea de tincturi cu concentrații alcoolice diferite

Materia primă a fost formată din :

- propolis (II) 10 g  
— alcoholum 30°, 50°, 70°, 95° q.s. ad 100 g

Propolisul și lichidul extractiv se introduc în vase de culoare brună, se închid bine și se mențin 10 zile la temperatură normală, agitându-se de 3—4 ori pe zi. Soluția alcoolică rezultată se filtrează prin hârtie de filtru, iar reziduul se spală cu vehiculul respectiv pînă se completează la greutatea adecvată. Tincturile se păstrează în flacoane închise la culoare, la temperatură de 8—10°C, timp de 7 zile, după care se filtrează.

Cercetările bacteriologice arată activitatea pozitivă a tincturilor preparate cu alcool 70° și 90° și mai puțin a celor preparate cu alcool 30° și 50°.

Specificare	Alcool 70°	Alcool 80°
Aspect	limpede	limpede
Culoare	galben-portocalie	galben-portocalie
Miros	aromat caracteristic	aromat caracteristic
Gust	ușor arzător	senzație de ușoară anestezie
pH	5,5	5,5
Cifra de tulbureală	5,68%	5,48%
Densitate 20°	0,883	0,883
Reziduu la evaporare	30 ml %	20 ml %

### Reacții generale

1 ml tinctură diluată cu 10 ml apă dă o soluție opalescentă, omogenă, fără precipitat sau flocoane. Soluția tulbure se clarifică cu adăus de alcool concentrat sau cu tensioactiv neionic (Tween 20 sau 80).

5 ml tinctură se amestecă cu NaOH 10% (pH 9—10); se adaugă HCl și lichidul se filtrează. După filtrare, identificarea se face prin dizolvare în alcool și colorare cu clorură ferică (R).

## Prepararea extractului fluid și moale de propolis

S-a lucrat astfel :

- propolis (II) 100 g  
— alcoholum 70° q.s.

Propolisul (100 g) se măruntește (sita II) și se introduce într-un cartuș celulozic, care apoi se trece într-un diacolator cilindric înalt de 35 cm, cu diametrul de 3,6 cm. Produsul se umectează cu lichid extractiv (puțin cîte puțin) pînă cînd acesta începe să curgă prin robinetul inferior deschis, iar deasupra amestecului se mai află un strat de lichid. Se închide robinetul și după 24 ore începe percolarea. În tot timpul extractiei produsul este acoperit cu lichid extractiv.

Initial se culeg separat 80 p. soluție extractivă. Percolatele ulterioare se concentrează sub presiune redusă la o temperatură sub 50°C,

pînă la îndepărtarea solventului. Reziduul se dizolvă în prima fractiune și se completează cu alcool 70° la greutatea de 100 g. Extractul fluid se păstrează la rece timp de 6 zile, apoi se filtroază. Acesta este un lichid lipede, de culoare brun roșcată, cu gust arzător, miscibil cu alcool 70° ; pH 5,7 ;  $\eta = 0,95$  ; cifra tulbureală 10 ml% ; rezidu 21,7%.

Extractul moale de propolis se prepară în aceleasi condiții ca extractul fluid, fără a se pune separat 80 p, percolarea efectuindu-se pînă la epuizarea propolisului de principiile active (1 g propolis, 6—8 g alcool 70°).

Soluția extractivă se evaporă și se concentrează la presiune redusă și la o temperatură sub 50°C. Randamentul în extract moale este de 39,5%.

Extractul moale este de culoare brun-roșcată, are consistența mierii, insolubil în apă, solubil în alcool concentrat și diluat, în propilenglicol, polietilenglicol 400, alcool izopropilic și benzilic (soluție care se amestecă cu uleiul de ricin) precum și în tween 80. Parțial, este solubil în ulei vegetal și mineral, glicerină și axungie. Solubil total în gliceride semi-sintetice.

#### **Prepararea de soluții injectabile cu extract moale de propolis în diferiți solvenți**

##### *A. Dizolvarea extractului în propilenglicol*

Extractum propolis spiss	20 g
Propilenglicolum q.s. ad	100 ml

Intr-o capsulă de porțelan se cîntăresc extractul și cantitatea dublă de propilenglicol. Se triturează pînă se obține o soluție care se trece într-un balon de 100 ml. Se aduce treptat din solventul anhidru peste extractul din capsulă, pînă ce tot produsul este trecut în balonul gradat.

Solventul de culoare brun-roșcată se lasă în repaus 24 ore, cînd depune un slab precipitat de culoare alb-gălbui. După decantare, soluția se înfiolează în fiole de 2 ml, care se închid și se sterilizează prin tindalizare 30 min la 70°, de 3 ori consecutiv la intervale de 24 ore.

##### *B. Dizolvarea extractului moale în polietilenglicol 400*

Extractum propolis spiss	20 g
Polietilenglicol 400 q.s. ad	100 ml

Extractul moale de propolis se dizolvă la rece în condiții asemănătoare tehnicii 1. Se obține o soluție vîscoasă, omogenă brun-roșcată care se conservă bine un an de zile, fără să depună. Se înfiolează în fiole de 2 ml, se închid și se sterilizează prin tindalizare.

##### *C. Dizolvarea extractului de propolis în ulei de ricin prin intermediul benzoatului de benzil (a) sau al alcoolului benzilic (b).*

a. extractum propolis	10 g
benzylium benzoicum	40 g
oleum ricini q.s. ad	100 ml

Extractul de propolis se dizolvă în benzoatul de benzil la temperatură de 35—40°C. Soluția obținută se amestecă cu uleiul de ricin (în prealabil sterilizat la etuvă — 140° — 2 ore și răcit). Soluția galben-portocalie se lasă în repaus 24 ore, apoi se înfiolează în fiole de 2 ml.

Experiențele de laborator arată că pentru dizolvare la 1 g extract sunt necesare 4 g benzoat de benzil. De asemenea, folosind 10% extract, soluția obținută este mai puțin viscoasă și se poate înfiola.

Soluția extract-benzoat de benzil nu se poate prepara cu uleiul de floarea-soarelui cînd rezultă un ulei opalescent, care în timp separă extractul sub formă de picături de culoare brună.

b. extractum propolis	10 g
alcoholum benzylicus	30 g
oleum ricini q.s. ad	100 ml

Dizolvarea extractului în alcool benzilic duce la o soluție clară, brun-roșcată cu pH-ul 6. Dacă se amestecă cu oleul de ricin, în prealabil sterilizat, se obține în final o soluție galben-portocalie care se infiolează în fiole de 2 ml.

#### **Prepararea de unguente cu extract moale de propolis dispersat în excipienți diferenți**

În literatură se găsesc prescrise unguentele preparate cu propolis brut, dispersat neomogen în diferite baze : vaselină, vaselină-lanolină, axungie, unt, etc.

Pentru prepararea unor unguente în care extractul de propolis să se poată dispersa omogen, noi am folosit fie bazele de unguent clasice, fie cele care au incorporate substanțe tensioactive care permit o mai bună dispersie a substanței active din extract. Astfel, extractul moale de propolis s-a dispersat în :

- a — vaselină-lanolină
- b — axungie-ceară-lanolină
- c — unguent emulsifiant neionic
- d — acid stearic, tween, span
- e — unguent hidrofilic cu polietilenglicoli
- f — gel de bentonită

a. Excipientul folosit curent în farmacie este vaselina cu adaos de 10% lanolină, ca agent de emulsionare.

extract propolis spiss	10 g
adeps lanae	10 g
vaselinum ad	80 g

Extractul moale se dispersează în 20 g bază de unguent (10 g lanolină și 10 g vaselină) în prealabil topite pe baia de apă și semisolidificate. După omogenizarea unguentului se adaugă restul de vaselină și se amestecă. Unguentul de culoarea muștarului are miros aromat, cînd extractul se dispersează bine.

b. Pentru a face o diferențiere între extractul moale de propolis dispersat în bază clasică, de unguent vaselină-Janolină și grăsime-axungie folosită în medicina populară, s-a preparat și un excipient cu axungie.

extractum propolis spissum	10 g
adeps lanae anhydricus	10 g
cera flava	5 g
axungia q.s. ad	100 g

Se dispersează extractul într-un amestec topit și semisolidificat de lanolină, ceară și cantități egale de axungie. Unguentul se omogenizează și se adaugă restul de grăsime. Dacă extractul moale se dispersează în axungie simplă, la rece, se obține la început un produs omogen. Pe măsură ce se amestecă, începe să se separe extractul.

Axungia cu ceară 5% dă un amestec moale. Lanolina 10% în axungie îmbunătățește calitatea unguentului. Adaosul de 5% ceară permite o bună conservare.

c. Extractul moale de propolis fiind solubilizat de tween 80, ne-am propus să folosim ca agent de dispersare unguentul emulsifiant neionic, care are în compoziția sa agentul tensioactiv în concentrație de 10%. Excipientul are formula :

alcoholum cetylicum	25 g
tween 80	80 g
paraffinum liquidum	20 g
vaselinum	45 g

Alcoolul cetilic, vaselina, tween-ul și uleiul de parafină se încălzesc într-o capsulă de portelan la circa 80°C. Amestecul fluidificat se trece într-un mojar încălzit și se amestecă pînă la răcire, obținîndu-se unguentul.

În excipientul de mai sus se dispersează 10% extract moale de propolis și se obține un unguent onctuos de culoarea muștarului. Cu apă, unguentul formează o emulsie ulei în apă, de culoare alb-gălbuiu.

d. Un alt excipient, care a permis o bună dispersare a extractului moale este acidul stearic alături de amestecul de agenți tensioactivi neionici — tween 60 și span 60.

extractum propolis spissum	5 g
acidum stearicum	12,5 g
span 60	10 g
tween 60	10 g
aqua q.s. ad	100 g

Acidul stearic, spanul 60 și tweenul 60 se topesc pe baia de apă. Se adaugă apă, care să aibă aceeași temperatură cu punctul de topire al amestecului și se omogenizează. Unguentul alb dispersează omogen la rece extractul de propolis.

Extractul de propolis s-a încorporat și într-o bază de unguent lavabilă cu polietilenglicoli. Baza este solubilă în apă, nu este grasă,

aderă bine de epidermă și se poate îndepărta ușor prin spălare cu apă. Prezintă o capacitate bună de difuzare a substanțelor încorporate.

polyaethylenglycolum	4000	40 g
polyaethylenglycolum	400	60 g

Componentele se încălzesc pe baie de apă la temperatura de 65°C și după fluidizare se amestecă pînă la răcire. În acest excipient hidrosolubil s-a dispersat extractul moai 10%. Unguentul este de culoare oliv omogen, care se poate dilua cu apă, cînd rezultă o emulsie gălbuiie, lăptoasă.

f. Dispersia extractului în gel de bentonită 5%.

bentonitum	5	g
ac. boricum	0,50	g
nipaginum	0,05	g
aqua q.s. ad.	100	g

În apă, la fierbere, se dizolvă nipaginul și acidul boric. Se adaugă bentonita, în mici porțiuni, în apa distilată, caldă (50°C). Se lasă în contact timp de 24 ore pentru hidratare. Se omogenizează și se completează cu apă la 100,0.

În gelul opac rezultat ,alb-gălbui, se dispersează extractul de propolis și rezultă un unguent omogen de culoare verzuie. Unguentul cu bentonită și extractul de propolis se poate dilua cu apă în orice proporție.

### Cercetări de laborator și clinice

Am cercetat acțiunea microbiană și antimicotică a diferitelor preparate de propolis prin tehnica antibiogramelor și fungigramelor — metoda difuzimetrică. Rezultatele obținute sunt cuprinse în tabelul 1. Menționăm că valorile din tabel reprezintă raza medie exprimată în mm, a zonei de inhibiție.

Preparatele de propolis și soluțiile martor sănt următoarele :

1. Extract fluid de propolis, preparat cu alcool 70° ;
2. Tinctură de propolis preparată cu alcool 70° ;
3. Alcool 70° (martor) ;
4. Soluție injectabilă de extract de propolis 20% în polietilenglicol 400 ;
5. Solvent — polietilenglicol 400 (martor) ;
6. Soluție injectabilă de extract de propolis 10%, în alcool benzilic 30 g și ulei de ricin 60 g ;
7. Solvent — alcool benzilic 30 g și ulei de ricin 60 g (martor) ;
8. Soluție injectabilă de extract de propolis 20%, în propilenglicol ;
9. Solvent — propilenglicol (martor) ;
10. Soluție injectabilă de extract de propolis 20% în benzoat de benzil 40 g și ulei de ricin 40 g ;
11. Solvent — benzoat de benzil 40 g și ulei de ricin 4 g (martor).

Tabelul 1

**Rezultatele obținute cu diferite preparate de propolis.**  
**Metoda difuzimetrică**

	I	II	III martor	IV	V martor	VI	VII martor	VIII	IX martor	X*)	XI martor
<i>Trichophyton schoenleinii</i>	7	6	0	10	0	12	12	5	0	3	2
<i>Trichophyton quinckeum</i>	10	8	0	8	0	10	10	12	0	2	1
<i>Microsporum audouini</i>	10	12	0	12	0	15	15	2	0	2	2
<i>Microsporum canis</i>	12	10	0	10	0	10	10	5	0	10	6
<i>Trichophyton rubrum</i>	16	12	0	12	0	8	8	10	0	10	2
<i>Trichophyton roseum</i>	18	12	0	12	0	12	12	12	0	6	6
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	15	5	0	5	0	5	5	10	0	2	2
<i>Trichophyton interdigitalis</i>	10	5	0	5	0	6	6	11	0	1	1
<i>Candida albicans</i>	3	1	0	5	0	10	8	10	2	1	0
<i>Stafilococ auriu</i>	5	3	0	6	0	10	5	0	0	0	0

\*) Raza medie exprimată în mm a zonelor de inhibiție.

Din analiza acestor date rezultă că vehiculele 3, 5, 9 n-au nici o acțiune antifungică. Vehiculul 11 are o slabă acțiune, iar vehiculul 7 o bună acțiune antifungică. Acțiune antifungică descrescindă au avut preparatele 1, 4, 6, 2, 8, 10, 11.

Pe baza rezultatelor fungigramelor se poate emite ipoteza că extractul de propolis în aplicații locale (încorporat în diferite vehicule), sau administrat parenteral poate da rezultate bune în tratamentul dermatomicozelor. De subliniat că soluțiile injectabile 4, 6, 8, și mai puțin 10, au o bună acțiune antifungică. Acest fapt ne îndreptăște să credem că aceste soluții ar putea constitui un adjuvant în tratamentul dermatomicozelor rebele, al celor locale sau generale cu griseofluvină.

Experimentarea biologică a soluțiilor injectabile dovedește să ele sănătate tolerante de animale de laborator.

Extractul fluid de propolis și tintura de propolis, în alcool 70° au *in vitro* o acțiune remarcabilă și împotriva următorilor dermatofiti: *Microsporum ferrugineum*, *Trichophyton equinum*, *T. verrucosum*, *T. tonsurans* și *T. violaceum* (s-a folosit tehnica diluțiilor succesive în mediu solid) și *Epidermophyton floccosum (inguinalis)*.

Preparatele au o slabă acțiune candidozică și nu inhibă dezvoltarea *Penicillium notatum* și *Aspergillus*. S-au observat și variații notabile în acțiunea antifungică a diferitelor sorturi de propolis. De asemenea, preparatele au o slabă acțiune împotriva stafilococului auriu.

S-au experimentat clinic tintura și extractul fluid de propolis preparate cu alcool 70°, precum și unguentele preparate prin dispersarea extractului moale de propolis în excipienți diferenți.

Tinctura de propolis a fost întrebuițată în epidermofitii eritemoscuamoase, prurite localizate și neurodermite. După badijonare se realizează o peliculă hidrofobă aderență care produce o cedare a pruritului, o ameliorare inconstantă a proceselor morbide, dar nu o vindecare.

Unguentele cu propolis s-au utilizat în concentrații de 10 și 20%, primele fiind mai bine tolerate de tegumente. Nu s-au observat deosebiri apreciabile ca acțiune terapeutică în funcție de concentrație și de baza în care a fost dispersat extractul moale de propolis. Unguentele au fost utilizate în următoarele afecțiuni: psoriazis, dermite eczematiforme, eczeme cronice, epidermofitii eritemoscuamoase și hiperkeratozice, eczeme micotice, dermite micotice chimice, prurite localizate cu sau fără lichenificări și neurodermite.

În psoriazis s-a observat o decapare a scuamelor, dar nu s-a observat o albire a leziunilor. În dermitete eczematiforme, se observă în unele cazuri o exacerbare a procesului cutanat de la prima aplicare, iar în altele o ameliorare inițială urmată de o exacerbare după 2–3 aplicații. În eczemele cronice uscate se observă o sedare apreciabilă a pruritului, o ameliorare a procesului patologic, dar nu vindecări. În epidermofitii eritemoscuamoase se obține o sedare a pruritului, o ameliorare a procesului morbid și vindecări în 11% din cazurile tratate. În formele hiperkeratozice s-au obținut ameliorări, dar nu vindecări. În eczeme micotice în fază acută și subacută se observă o exacerbare a procesului eczematos, în fază cronică o diminuare a pruritului, ameliorări în majoritatea cazurilor și vindecări în 5% din cazuri. În dermitete micotice chimice rezultatele sunt comparabile cu cele din dermitete eczematiforme.

Rezultate apreciabile s-au obținut în prurite localizate și neurodermită, unde după 1–2 aplicări s-a obținut o sedare a pruritului, iar după 4–5 aplicări o ameliorare a procesului cutanat. Au fost și cazuri, cind după perioada de ameliorare s-a observat apariția unui eritem însoțit de prurit, datorită probabil unui mecanism alergic.

Acțiunea favorabilă în aceste cazuri se datorește probabil efectului anestezic al extractului de propolis și formării unei pelicule superficiale, care suprimă acțiunea excitantilor externi.

Extractul fluid de propolis a fost întrebuițat cu rezultate bune în 50 cazuri de afte cronice bucale, recidivante, sub formă de badijonări zilnice. În 86% din cazurile tratate durerea a dispărut în 24 ore permanentă alimentația normală a bolnavului, iar aftele s-au vindecat în 3 zile. În 10% din cazuri s-a observat o sedare a durerii în primele 24 ore și o dispariție totală în 3 zile, iar aftele s-au vindecat în medie în 6 zile. În 4% din cazuri rezultatele au fost slabe sau nule.

În ceea ce privește acțiunea asupra recidivelor, în 12% din cazuri urmărite 16 luni, nu s-a observat mărire nici unui puseu. În 82% din cazuri s-a observat mărirea perioadei între pusee de la 1–4 luni la 3–12 luni, iar în 6% din cazuri nu s-a înregistrat nici o acțiune asupra recidivelor, fiind influențat favorabil numai puseul acut.

Într-un caz de afte bucale cu pusee la intervale de 4 luni, rebele la toate tratamentele locale și generale, am obținut o sedare a durerii, o ameliorare evidentă a leziunilor, dar nu o vindecare, după un tra-

tament de 15 zile. Efectuarea unui frotiu a pus în evidență prezența de fuzospirili. Continuarea tratamentului cu o soluție de bismut liposolubil a dus la vindecarea bolnavului. Acest caz deosebit de interesant ne arată că în cazurile de afte cronice recidivante, rebele la tratamentul cu extract fluid de propolis, sunt recomandabile investigații pentru depistarea eventualei infecții cu fuzospirili, pentru a completa tratamentul cu o soluție de bismut hidro sau liposolubil sau mai bine cu arsenic.

De asemenea, putem conchide că extractul fluid de propolis nu are acțiune asupra fuzospirililor. Acțiunea favorabilă a extractului fluid de propolis s-ar putea să se realizeze prin mecanisme multiple :

- formarea unei pelicule la suprafața leziunilor ulceroase, cu suprimarea acțiunii iritante a excitanților externi ;
- acțiunea anestezică puternică care suprimă durerea și spasmul vascular, favorizând astfel vindecarea ;
- acțiunea antivirotică ; unii autori admit etiologia virală în aftele cronice recidivante.

Am indicat mai sus numai o parte a rezultatelor noastre în experimentarea formelor farmaceutice.

Cercetările sint în curs atât pentru experimentarea clinică a soluțiilor injectabile cît și pentru alte preparate.

### Concluzii

Din propolis, produs apicol, s-au preparat tincturi, extract fluid și extract moale. Extractul moale a servit pentru prepararea unor forme farmaceutice : soluții injectabile și unguente.

Experimentările au dovedit că cel mai bun vehicul pentru prepararea tincturilor, extractului fluid și moale este alcoolul 70°.

S-au preparat 4 produse injectabile având drept vehicul solventi neapoși : propilenglicol (a), polietilenglicol 400 (b) și uleiul de ricin, folosind drept intermediu benzoatul de benzil (c) sau alcoolul benzilic (d).

Extractul moale de propolis s-a dispersat în 6 faze de unguent : vaselină-lanolină (a) ; axungia-ceară-lanolină (b) ; unguent emulsifiant neionic (c) ; unguent cu acid stearic, span, tween (d) ; unguent hidrofilic cu polietilenglicoli (e) și cu gel de bentonită (f).

Cercetările de laborator și clinice au stabilit acțiunea antimicrobiană a preparatelor. Soluțiile injectabile prezintă *in vitro* o bună acțiune antifungică.

Tinctura și extractul fluid de propolis au *in vitro* o acțiune remarcabilă împotriva dermatofitilor : *Microsporum ferrugineum*, *Trichophyton equinum*, *T. verrucosum*, *T. tonsurans* și *T. violaceum*, *Epidermophyton floccosum* (*inguinalis*).

Unguentele experimentate clinic în numeroase afecțiuni cutanate au indicat rezultate apreciabile numai în prurite localizate și neurodermite.