



UNIWERSYTET RZESZOWSKI
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Instytut Technologii Żywności i Żywienia

mgr inż. Ewelina Sylwia Sidor

Nr albumu: 86573

Dyscyplina: Technologia Żywności i Żywienia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Analiza składu chemicznego i aktywności biologicznej preparatów z czerwiu trutowego oraz możliwość ich wykorzystania w projektowaniu suplementów diety

Analysis of the chemical composition and biological activity of drone brood preparations and the possibility of their use in the design of dietary supplements

Wykonana pod kierunkiem:

Promotora *prof. dr hab. inż. Małgorzaty Dżugan*

Promotora pomocniczego *dr inż. Moniki Tomczyk*

Rzeszów, 2023

Składam serdeczne podziękowania:

Pani Promotor, prof. dr hab. inż. Małgorzacie Dżugan za ogromne zaangażowanie, przekazanie cennej wiedzy, ciągłą gotowość do udzielania wskazówek, życzliwość oraz poświęcony czas w trakcie realizowania niniejszej rozprawy doktorskiej

Pani Promotor Pomocniczej dr inż. Monice Tomczyk za okazaną życzliwość, opiekę, pomoc i cenne wskazówki podczas prowadzenia badań

Wszystkim osobom z Zakładu Chemii i Toksykologii Żywności, które swoją pomocą, cennymi radami i dobrym słowem wspierali mnie w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej

Pszczelarzom, w szczególności ***Pani Elżbiecie Flis, Panu Bogdanowi Rogala i Panu Jerzemu Bańkowskiemu*** za zaangażowanie i pomoc w przygotowaniu badanego materiału

Rodzicom za ciągłą motywację, wsparcie oraz cały trud włożony w moje wychowanie

Bartkowi za wsparcie, dodawanie otuchy, wiarę we mnie i moje możliwości. Dziękuję, że jesteś – Ty wiesz...

Spis treści

Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	4
Streszczenie.....	5
Summary.....	7
1. Wstęp	9
1.1. Pochodzenie i skład chemiczny czerwiu trutowego	10
1.2. Czerw trutowy jako środek apiterapeutyczny	12
2. Cel i hipotezy badawcze	14
3. Materiał i zastosowane metody.....	15
3.1. Materiał badany	15
3.2. Etapy badań.....	16
3.3. Metody badań	16
4. Omówienie wyników i dyskusja	21
4.1. Aktywność biologiczna czerwiu trutowego	21
4.1.1. Wpływ stadium rozwoju czerwiu na zawartość składników bioaktywnych	21
4.1.2. Wpływ warunków pasiecznych na aktywność antyoksydacyjną czerwiu trutowego	29
4.1.3. Różnice w składzie czerwiu trutowego i mlecza pszczelego	30
4.3. Utrwalanie czerwiu trutowego.....	32
4.3.1. Liofilizacja.....	32
4.3.2. Utrwalenie w miodzie rzepakowym.....	34
4.4. Możliwości wykorzystania czerwiu trutowego jako suplementu diety	37
4.4.1. Analiza biodostępności składników bioaktywnych z zaprojektowanych suplementów na bazie czerwiu trutowego.....	38
4.4.2. Bezpieczeństwo stosowania preparatów z czerwiu trutowego.....	42
4.5. Perspektywy rozwoju badań nad czerwim trutowym	45
5. Podsumowanie i wnioski	47
6. Literatura.....	50
Aneks: Pozostałe osiągnięcia naukowe	55

Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Podstawę niniejszej dysertacji stanowi artykuł przeglądowy oraz cztery opublikowane oryginalne artykuły w czasopismach naukowych.

Publikacja I. Ewelina Sidor (80%), Małgorzata Dżugan. *Drone Brood Homogenate as Natural Remedy for Treating Health Care Problem: A Scientific and Practical Approach*. *Molecules* 2020, 25 (23), 5699, doi.org/10.3390/molecules25235699.

Publikacja II. Ewelina Sidor (50%), Michał Miłek, Grzegorz Zaguła, Aleksandra Bocian, Małgorzata Dżugan. *Searching for Differences in Chemical Composition and Biological Activity of Crude Drone Brood and Royal Jelly Useful for Their Authentication*. *Foods* 2021, 10 (9), 2233, doi.org/10.3390/foods10092233.

Publikacja III. Ewelina Sidor (60%), Michał Miłek, Monika Tomczyk, Małgorzata Dżugan. *Antioxidant Activity of Frozen and Freeze-Dried Drone Brood Homogenate Regarding the Stage of Larval Development*. *Antioxidants* 2021, 10 (5), 639, doi.org/10.3390/antiox10050639.

Publikacja IV. Ewelina Sidor (70%), Monika Tomczyk, Michał Miłek, Małgorzata Dżugan. *The effect of storage time on the antioxidant activity and polyphenolic profile of frozen and lyophilized drone brood fixed in honey*. *Food. Science. Technology. Quality* 2022, 29 (2), 45-56, doi.org/10.15193/zntj/2022/131/415.

Publikacja V. Małgorzata Dżugan, Ewelina Sidor (40%), Michał Miłek, Monika Tomczyk. *The possibility of using bee drone brood to design novel dietary supplements for apitherapy*. *Applied Sciences* 2023, 13 (8), 4687, doi.org/10.3390/app13084687.

Sumaryczny współczynnik IF = 20,485;

Suma punktów MEiN = 430

(dane: <http://bibliografia.ur.edu.pl/>, współczynnik IF i punktacja podane na rok opublikowania pracy)

Streszczenie

Czerw trutowy to mniej znany i przebadany produkt pszczele, przez pszczelarzy często traktowany jako odpad, bywa wykorzystywany jako naturalny sposób walki z warrozą. Ze względu na unikalny skład chemiczny w krajach Europy Wschodniej i Azji jest ceniony i stosowany w prewencji/leczeniu wielu chorób, w tym niepłodności męskiej i zaburzeń menopauzy u kobiet.

Celem pracy była analiza składu chemicznego i aktywności biologicznej preparatów wytworzonych z czerwiu trutowego oraz możliwość ich wykorzystania w projektowaniu suplementów diety. Po raz pierwszy analizowano zmienność składu w zależności od fazy rozwoju i pochodzenia pasiecznego. Ze względu na niską trwałość materiału poszukiwano skutecznej metody jego utrwalenia. Utrwalony czerw wykorzystano do zaprojektowania innowacyjnego suplementu diety i oceniono jego biodostępność metodą symulowanego enzymatycznego trawienia.

Badania przeprowadzono dla czerwiu trutowego pozyskanego w trzech fazach rozwoju z trzech podkarpackich pasiek. Bezpośrednio po pobraniu materiał zhomogenizowano i przechowywano w stanie zamrożonym do czasu analiz. Analizowano następujące parametry: zawartość testosteronu i estradiolu (metodą ELISA), aktywność antyoksydacyjną i profil związków polifenolowych (HPTLC), zawartość białka i profil białkowy (SDS-PAGE), aktywność enzymatyczną (diastaza, inne glikozydazy) oraz zawartość składników mineralnych (ICP-OES).

Badania wykazały, że czerw trutowy niezależnie od fazy rozwoju (dzień 7, 11 i 14) stanowi cenne źródło wielu składników, przy czym wraz z postępowaniem rozwoju obserwowano wzrost zawartości testosteronu i białka oraz wzbogacenie profilu białkowego. Większą aktywność antyoksydacyjną stwierdzono na wcześniejszych etapach rozwoju (7-11 dzień), przy czym frakcję dominującą stanowiły antyoksydanty hydrofilowe, głównie kwasy fenolowe i flawonoidy. Wykazano, że mimo podobieństw w składzie czerwiu trutowego i mleczka pszczelego pomiary aktywności markerowych kwaśnych glikozydaz (N-acetylo-heksozaminidazy i α -glukozydazy) oraz zawartości żelaza pozwalają jednoznacznie rozróżnić te materiały.

Utrwalenie czerwiu trutowego metodą liofilizacji pozwoliło zachować potencjał antyoksydacyjny czerwiu i całkowitą zawartość związków polifenolowych (ok. 10%

strat). Utrwalenie czerwiu mrożonego (max. dodatek 4%) pozwoliło na pełne zachowanie jego właściwości antyoksydacyjnych podczas 6-miesięcznego przechowywania w temperaturze pokojowej. Miód wzbogacony czerwiem trutowym stanowi wygodną formę wprowadzenia małych dawek czerwiu do diety. Zwiększenie udziału czerwiu mrożonego w miodzie powoduje jego fermentację, takie ograniczenie nie występuje w przypadku stosowania czerwiu liofilizowanego jako dodatku do miodu.

Liofilizowany czerw trutowy wykorzystano do przygotowania innowacyjnego dwuskładnikowego suplementu diety w wygodnej do stosowania formie kapsułek. Preparat wzbogacono w wapń, porównawczo stosując węglan wapnia (forma nieorganiczna) i zmielone skorupy jaj (organiczna). Z wykorzystaniem symulowanego trawienia *in vitro* oceniono biodostępność wybranych składników (hormony, wapń, białko, antyoksydanty i polifenole). Wykazano, że w obecności wapnia hormony czerwiu, inaczej niż polifenole, są lepiej biodostępne w jelicie, rośnie także strawność białka. Ocena dziennego pobrania składników bioaktywnych z zaprojektowanych suplementów potwierdziła bezpieczeństwo ich stosowania.

Przeprowadzone badania dostarczyły nowych istotnych informacji odnośnie technologii pozyskiwania czerwiu trutowego o optymalnej bioaktywności oraz korzystnego sposobu jego utrwalenia. Zaprojektowany suplement na bazie naturalnych składników może znaleźć zastosowanie w prewencji lub leczeniu osteoporozy, jednak przed wdrożeniem jego skuteczność należy potwierdzić w badaniach *in vivo*.

Summary

Drone brood is a less-known and studied bee product, often treated as waste by beekeepers, it is sometimes used as a natural way to combat varroa. Due to its unique chemical composition in Eastern European and Asian countries, it is valued and used for the prevention/treatment of many diseases, including male infertility and menopausal disorders in women.

The purpose of this study was to analyze the chemical composition and biological activity of manufactured drone brood preparations and the possibility of their use in the design of dietary supplements. For the first time, the variation of the composition depending on the stage of development and apiary origin was analyzed. Due to the low durability of the material, an effective method of fixing it was sought. The fixed brood was used to design an innovative dietary supplement and its bioavailability was evaluated by simulated enzymatic digestion.

The study was conducted for drone brood obtained at three stages of development from three Subcarpathian apiaries. Immediately after collection, the material was homogenized and stored frozen until analysis. The following parameters were analyzed: testosterone and estradiol content (by ELISA), antioxidant activity and profile of polyphenolic compounds (HPTLC), protein content and protein profile (SDS-PAGE), enzymatic activity (diastase, other glycosidases) and mineral content (ICP-OES).

The study showed that drone brood regardless of developmental stage (day 7, 11 and 14) is a valuable source of many components, and with the progress of development, an increase in testosterone and protein content and an enrichment of the protein profile were observed. Higher antioxidant activity was found at earlier stages of development (day 7-11), with hydrophilic antioxidants, mainly phenolic acids as well as flavonoids, being the dominant fraction. It was shown that despite similarities in the composition of drone brood and royal jelly, measurements of the activity of marker acid glycosidases (N-acetyl-hexosaminidase and α -glucosidase) and iron content make it possible to clearly distinguish between these materials.

Fixation of drone brood by freeze-drying preserved the antioxidant potential of the brood and the total content of polyphenolic compounds (about 10% loss). Fixation of frozen brood (maximum addition of 4%) allowed full preservation of its antioxidant

properties during 6-month storage at room temperature. Honey enriched with drone brood is a convenient form of introducing small doses of brood into the diet. Increasing the proportion of frozen brood in honey results in its fermentation, such a limitation does not occur when freeze-dried brood as a honey additive was used.

Freeze-dried drone brood was used to prepare an innovative two-ingredient dietary supplement in a convenient-to-use capsule form. The preparation was enriched in calcium, comparatively using calcium carbonate (inorganic form) and ground eggshells (organic). The bioavailability of selected components (hormones, calcium, protein, antioxidants as well as polyphenols) was evaluated using simulated *in vitro* digestion. It was shown that in the presence of calcium, brood hormones, unlike polyphenols, are better bioavailable in the intestine, and protein digestibility also increases. Evaluation of the daily intake of bioactive components from the designed supplements confirmed the safety of their use.

The conducted research provided new important information regarding the technology of obtaining drone brood with optimal bioactivity and the favorable way of its fixation. The designed supplement based on natural ingredients may find application in the prevention or treatment of osteoporosis, but its effectiveness should be confirmed in *in vivo* studies.

1. Wstęp

Czerw trutowy to kolejne stadia rozwojowe trutni (męskich osobników pszczoły miodnej *Apis mellifera*): jaja, larwy, przedpoczwarki i poczwarki. Larwy i młode przedpoczwarki trutni stanowią wyjątkowo cenne źródło składników bioaktywnych i są w wielu regionach świata stosowane jako pokarm, a nawet naturalny lek. W praktyce pszczelarskiej czerw trutowy jest traktowany jako odpad, a jego usuwanie z ula stanowi biologiczną metodę walki z warrozą, jedną z trudniejszych do zwalczenia chorób pszczół. Czerw trutowy wykazuje wysoką aktywność biologiczną i wszechstronnie korzystny wpływ na organizm człowieka. W medycynie naturalnej produkt jest stosowany m. in. w leczeniu niepłodności u mężczyzn, łagodzeniu objawów menopauzy, leczeniu chorób tarczycy, miażdżycy, a także chorób depresyjnych. Mimo tak szerokiego spektrum stosowania, jest wciąż słabo scharakteryzowanym produktem pszczelim.

W literaturze polskiej i zagranicznej dostępne są nieliczne opracowania, w większości pochodzące z Rumunii i Ukrainy, charakteryzujące skład chemiczny, właściwości oraz aktywność biologiczną czerw trutowego. Zainteresowanie naukowe tym mało znanym produktem pszczelim ciągle rośnie, na co wskazują wyniki przeszukiwania bazy danych Scopus, w 2020 roku było to łącznie 393 dokumenty, głównie koncentrujące się na biologii rozwoju larw pszczelich. Pomimo doniesień prasowych dotyczących korzyści z jego stosowania, jedynie nieliczne publikacje dotyczą zawartości składników odżywczych w czerw trutowym (Finke 2005). Badania nad czerwem krajowym nie były prowadzone przez długi czas, dopiero w grudniu 2019 roku pojawiła się w czasopiśmie *Journal of Ethnopharmacology* (z ograniczonym dostępem) pierwsza praca przeglądowa z Uniwersytetu w Białymstoku, dotycząca zwięzłej charakterystyki tego produktu pszczelego (Sawczuk i in. 2019). Publikacja oryginalna, prezentująca wyniki badań tych Autorów pojawiła się dopiero w lipcu 2022 (Sawczuk i in. 2022).

Dostępne informacje wskazywały na wysoką, w porównaniu do innych produktów pszczelich, zawartość licznych składników odżywczych (białka, lipidy, kwasy tłuszczowe, węglowodany), witamin (A, B, E i D), minerałów i hormonów sterydowych. Brakowało jednak opracowania naukowego opisującego zależność aktywności

biologicznej od stadium rozwoju czy pochodzenia larw oraz wpływu metody utrwalania na retencję składników bioaktywnych. Nieliczne publikacje przedstawiały wyniki badań nad aktywnością biologiczną czerwiu. Przytoczone luki badawcze w odniesieniu do czerwiu trutowego stanowiły główne przesłanki, które przyczyniły się do powstania tej pracy. Jej aktualność wzrosła w obliczu dopuszczenia owadów jadalnych jako alternatywnego źródła białka zwierzęcego. Dostarczenie naukowych dowodów nt. skuteczności oraz bezpieczeństwa stosowania czerwiu trutowego ma kluczowe znaczenie dla stosowania czerwiu w profilaktyce chorób oraz stwarza nowy kierunek rozwoju gospodarki pasiecznej.

1.1. Pochodzenie i skład chemiczny czerwiu trutowego

Pierwszym etapem niniejszej rozprawy doktorskiej było zgromadzenie dostępnych informacji nt. aktualnego stanu badań nad czerwiem trutowym w bazach literatury światowej, które wykorzystano do opracowania artykułu przeglądowego (**publikacja I**). Przeszukiwanie baz naukowych (Web of Science, Scopus, Informator) wg słów kluczowych („drone brood”, „drone homogenate”, „bee drone brood”, „Apilarnil”, „czerw trutowy”) pozwoliło na zgromadzenie 69 pozycji piśmiennictwa, wykorzystane do opracowania poszczególnych rozdziałów artykułu, skupiających się na pochodzeniu, stabilności i utrwalaniu, charakterystyce składników chemicznych czerwiu, aktywności farmakologicznej i zastosowaniu w suplementacji diety. Szczególnie wartościową częścią artykułu był przegląd aktualnych rozwiązań aplikacyjnych dotyczących czerwiu trutowego (zgłoszonych patentów) dostępnych w Bazie Espacenet.

Czerw trutowy (homogenat czerwiu trutowego, mleczko trutowe), w formie liofilizowanej jest znany jako Apilarnil lub Apistimul (Iliesiu 1988), definiowany jako różne stadium rozwojowe trutni (jajo, larwa, przedpoczwarka, poczwarka), które rozwijają się w komórkach plastra z niezapłodnionych jaj matki pszczelej. Rozwój trutni trwa najdłużej (24 dni) spośród wszystkich osobników w rodzinie pszczelej, podczas gdy pszczoła robotnic wynosi 21 dni, a matki pszczelej 16 dni. W trakcie pierwszych dni po zniesieniu przez matkę jaj, trutnie rozwijają się w komórce otwartej (niezasklepionej). W tym czasie karmicielki dostarczają larwom pokarm, dzięki któremu mogą się prawidłowo rozwijać. Dziesiątego/jedenastego dnia pszczoły zasklepiają

czerw trutowy wieczkiem wypukłym (Czekońska i Tofilski 2010), dzięki temu czerw trutowy w plastrze jest łatwy do identyfikacji. Rola dorosłych trutni w sezonie pasiecznym polega głównie na zapłodnieniu matki pszczelej, a ich populacja w ulu stanowi 5-10% rodziny pszczelej. W związku z tym, pszczelarze traktują czerw trutowy jako odpad, a czasami (w przypadku niezasklepionego czerw trutowego) jako naturalny poławiacz warrozy (*Varroasis apium*). Takie zabiegi są najczęściej praktykowane w krajach skandynawskich (Jensen i in. 2019; Budnikova 2009). Z jednej rodziny pszczelej istnieje możliwość pozyskania w pasiece do 1200 g larw trutowych, 500 g larw pszczelich i tylko 30 g larw matecznych (Prokhoda 2009). Ponadto należy zaznaczyć, że pozyskiwanie czerw trutowego nie osłabia siły rodziny pszczelej.

Czerw trutowy pozyskiwany w celach technologicznych należy pobierać w odpowiednim dniu rozwoju, co opisano w **publikacji I**. W tej kwestii dane literaturowe są mocno rozbieżne, przy czym najczęściej wymieniany zakres to 6-14 dni (Stangaciu i Hartenstein 2007; Sołodenko 2015; Prokhoda 2009; Budnikova 2009; Komisar 2006; Kryłow i in. 2007; Czerkasowa i Prokhoda 2006; Budnikova 2009). Różnice w ustaleniu optymalnej fazy wynikają z uwzględnienia przez niektórych badaczy zmiennej aktywności biologicznej czerw trutowego, podczas gdy inni skupiali się na przydatności materiału do przetworzenia. Pobranie larw z komórek plastra może być łatwiejsze przed zasklepieniem, ponieważ larwy można wyplukać strumieniem wody, a w przypadku komórek zasklepionych przed przystąpieniem do ręcznego rozdzielania należy plaster zamrozić (Krell 1996). Szybką i mniej pracochłonną metodą jest wyciskanie niezamrożonych lub rozmrożonych plastrów czerw nad sitem (Jensen 2019).

Homogenat czerw trutowego (mechanicznie rozdrobniony czerw) to mleczna gęsta substancja o barwie biało-żółtej i specyficznym zapachu wykazujący bogaty skład chemiczny, w którym dominują: białka (7-10%), węglowodany (7-8%), tłuszcze (3-5%), składniki mineralne (popiół 3%), a woda stanowi ok 80% (**publikacja I**, tab. 1). Taki produkt wykazuje wysoką zawartość hormonów sterydowych (testosteron, progesteron i estradiol) i prolaktyny (**publikacja I**, fig. 3) oraz witamin i biopierwiastków (**publikacja I**, tab. 2). Dodatkowo odznacza się wysoką wśród produktów pszczelich zawartością polifenoli i aktywnością antyoksydacyjną (**publikacja I**, tab. 3). Zawartość hormonów, białka, enzymów i biopierwiastków wpływa na wysoką

aktywność biologiczną czerwiu trutowego. Analiza danych literaturowych wskazuje, że skład chemiczny czerwiu zmienia się w zależności od stadium rozwoju, przy czym największe różnice stwierdzono analizując zawartość suchej masy, białka i lipidów (Bogdanov 2016; Burmistrova 1999; Isidorov 2013; Mandla i Kumar 2016, Sawczuk i in. 2022).

W **publikacji I** poruszono również temat utrwalania czerwiu trutowego, który niezależnie od etapu rozwoju jest materiałem o bardzo niskiej stabilności, dlatego jego szybkie utrwalenie (maksymalnie w ciągu 24 godzin) jest niezwykle istotne. W literaturze przedstawiono różne sposoby utrwalania czerwiu trutowego: przechowywanie w warunkach chłodniczych (Kryłow i in. 2007), mrożenie larw lub homogenatów w ciekłym azocie (-196 °C) (Kryłow i in. 2007), mieszanie larw z 40% alkoholem etylowym w stosunku 1:1 (Hockling i Matsumura 1960; Wilde 2002), suszenie (Sakai i in. 1978), osadzanie na adsorbencie (Bogdanov 2012), konserwowanie w miodzie (Kryłow i in. 2007), liofilizacja (Ciurzyńska i Lenart 2011).

1.2. Czerw trutowy jako środek apiterapeutyczny

W **publikacji I** omówiono także aspekt wykorzystywania czerwiu trutowego jako środka spożywczego i leczniczego/wykazującego działanie prewencyjne w chorobach cywilizacyjnych. Czerw trutowy jest wykorzystywany m.in. w Japonii, Chinach, Rumunii, Rosji czy Ukrainie do przygotowywania przekąsek w formie smażonej lub pieczonej bądź gotowanej, w postaci sosów (Sawczuk i in. 2019). Istnieje również możliwość przygotowania z czerwiu nalewek, konfitur lub słodyczy. Wraz z postępem nauki i technologii, w tych krajach czerw trutowy znajduje zastosowanie w produkcji suplementów diety i leków (Jensen 2019; Ulmer i in. 2020). W sprzedaży internetowej, głównie w krajach poza Unią Europejską dostępne są produkty komercyjne, w tym rumuński Apilarnil Potent, kanadyjski ApiDhron®, słoweński Femoklim® czy turecka Harşena Apiterapi Ürünleri (**publikacja I**). W krajach Unii Europejskiej, np. w Polsce pasieki coraz częściej posiadają w ofercie mrożony czerw trutowy, ale także produkty na bazie czerwiu trutowego, także w połączeniu z propolisem i pyłkiem czy miodem (www.miodbartnik.pl).

Producenci, którzy oferują czerw trutowy zalecają codzienne spożycie liofilizowanego czerwiu trutowego w dawce 300 mg dla dorosłych, w razie potrzeby

dawkę można zwiększyć do 600-900 mg (Kędzia i in. 2017). Dawki te wynikają z doświadczeń naturoterapeutów, którzy stosują ten środek w apiterapii, brakuje jednak badań toksykologicznych, potwierdzających brak skutków ubocznych lub bezpiecznej do stosowania dawki. Prawdopodobnie takie badania były prowadzone w Rosji, skąd pochodzi zdecydowana większość patentów dotyczących produkcji suplementów opartych na czerwiu trutowym, polecanych do wspomagania funkcjonowania organizmu. W ogólnościatowej bazie patentów „Espacent” (<http://espacent.com>), dla kombinacji słów kluczowych „truteń”, „czerw” i „suplement” uzyskano 75 rozwiązań, przy czym większość pochodziła z rosyjskiej firmy PARAFARM (<http://parapharm-russia.ru>).

Dostępne doniesienia naukowe wskazują, że czerw trutowy wykazuje wielokierunkowe korzystne działanie na organizm człowieka (rys. 1). Skutecznie zapobiega problemom z płodnością i libido u mężczyzn (Bołatovna i in. 2015; Shoinbayeva i in. 2017), obniża poziom cholesterolu i trójglicerydów (Vasilenko i in. 2002), działa hepatoprotekcyjnie (Vasilenko i in. 2005) i pobudza układ odpornościowy (Wyszyńska i in. 2008). Ponadto wykazuje właściwości ochronne dla płodu (Kabała-Dzik i in. 2007), działa leczniczo w chorobach nerwowych i psychicznych (Bogdanov 2016), działa przeciwmiażdżycowo i antyoksydacyjnie (Vasilenko i in. 2005; Bieljajew i Safonowskaja 2009). Intensywnie badane jest działanie czerwiu na układ rozrodczy i płodność męską oraz zaburzenia związane z menopauzą u kobiet, w tym przeciwdziałanie osteoporozie (**publikacja I**, tab. 4 i 5). Pomimo rosnącego zainteresowania naukowców, czerw trutowy pozostaje wciąż mało znanym i niedocenionym produktem pszczelim.



Rysunek 1. Korzystne działanie czerwiu trutowego na organizm człowieka (**publikacja I**, wg graphical abstract).

2. Cel i hipotezy badawcze

Głównym celem pracy była ocena składu chemicznego i aktywności biologicznej preparatów z czerwiu trutowego oraz możliwość ich wykorzystania w projektowaniu suplementów diety. Do realizacji wyznaczono następujące **cele szczegółowe**:

1. Analiza aktywności biologicznej homogenatu czerwiu trutowego pozyskanego z podkarpackich pasiek.
2. Określenie stadium rozwoju larw o najwyższej aktywności biologicznej.
3. Dobór optymalnej metody utrwalenia homogenatu czerwiu trutowego i wytwarzanie preparatów.
4. Zastosowanie czerwiu trutowego do projektowania suplementów diety o wysokiej biodostępności.

Przeprowadzone badania miały zweryfikować następujące **hipotezy badawcze**:

1. Homogenat czerwiu trutowego jest obfitym źródłem składników bioaktywnych.
2. Faza rozwoju larwy istotnie wpływa na aktywność biologiczną homogenatu czerwiu trutowego.
3. Liofilizacja pozwala zachować cenne składniki czerwiu trutowego o dobrej biodostępności.
4. Czerw trutowy może być rekomendowany jako wartościowy suplement diety o dobrej przyswajalności składników odżywczych i bioaktywnych.

3. Materiał i zastosowane metody

3.1. Materiał badany

Świeży *czew trutowy* pozyskano w trzech fazach rozwoju: larwy (7 dniowa), przedpoczwarki (11 dniowa) i poczwarki (14 dniowa), licząc od dnia wyklucia larwy, z rodzin pszczelich *Apis mellifera carnica*, z trzech pasiek zlokalizowanych na terenie województwa Podkarpackiego (Breń Osuchowski, Wola Zarczycka, Więckowice). Czerw wybierano z plastrów ręcznie i bezpośrednio po pobraniu materiał utrwalano poprzez mrożenie w temperaturze $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zamrożone tkanki poddawano homogenizacji mechanicznej, a następnie ekstrakcji z użyciem wody lub 70% etanolu jako rozpuszczalnika w zależności od oznaczanego składnika. Szczegółowy opis procedur ekstrakcji został zamieszczony w **publikacjach II-V**. Łącznie do badań w latach 2020-2022 wykorzystano 27 niezależnie pobranych próbek czerwiu. Analizom laboratoryjnym poddano następujące warianty próbek:

- *Czerw liofilizowany* uzyskano na drodze suszenia sublimacyjnego w liofilizatorze Alpha 1-2 LG plus, Martin Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode, Niemcy). Proces liofilizacji prowadzono od 55 do 73 godzin (+ 2 godziny dosuszania) w zależności od objętości próbki, pod ciśnieniem 0,1 Bar.
- *Suchy ekstrakt czerwiu* uzyskano ekstrahując liofilizowany czerw wodą w proporcji 1 g/10 ml, a po odwirowaniu supernatant odwodniono na drodze liofilizacji (warunki jw.)
- *Miód z dodatkiem czerwiu* uzyskano na drodze mieszania kremowanego miodu rzepakowego z 1, 2 lub 4% w/w dodatkiem czerwiu (mrożony lub liofilizat).
- *Mleczko pszczele* jako materiał porównawczy uznawany jako odpowiednik czerwiu trutowego pozyskano w trzech pasiekach zlokalizowanych na terenie województwa Podkarpackiego, tych samych, z których pozyskiwano czerw trutowy. Niezwłocznie po wycięciu mateczników z plastra mleczko pszczele zamrożono w $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do czasu analiz.
- *Suplementy na bazie czerwiu - liofilizowany (7-dniowy)* czerw trutowy połączono w jednej kapsułce z osłonki żelatynowej z organicznym/nieorganicznym wapniem w postaci zmielonych skorupki jaj kurzych/węglanem wapnia. Wariantem podstawowym było 300 mg liofilizowanego czerwiu trutowego w kapsułce (suplement DB). Wariant wzbogacony zawierał oprócz czerwiu (jw.) 250 mg

zmielonych skorupki jaj kurzych lub węglanu wapnia. Jako próbę kontrolną przygotowano kapsułki z różnymi formami wapnia bez czerw trutowego.

3.2. Etapy badań

Realizacja pracy doktorskiej obejmowała następujące etapy:

Etap I: Analiza zawartości składników bioaktywnych w czerw z uwzględnieniem fazy rozwoju i pochodzenia oraz poszukiwanie markerów, pozwalających jednoznacznie odróżnić czerw trutowy od mlecza pszczelego (**publikacja II i III**).

Etap II: Analiza wpływu różnych metod utrwalania czerw trutowego na zmiany potencjału antyoksydacyjnego, całkowitej zawartości związków polifenolowych i profil polifenolowy (**publikacja III i IV**).

Etap III: Ocena biodostępności składników czerw z zaprojektowanych suplementów diety i ocena bezpieczeństwa ich stosowania (**publikacja V**).

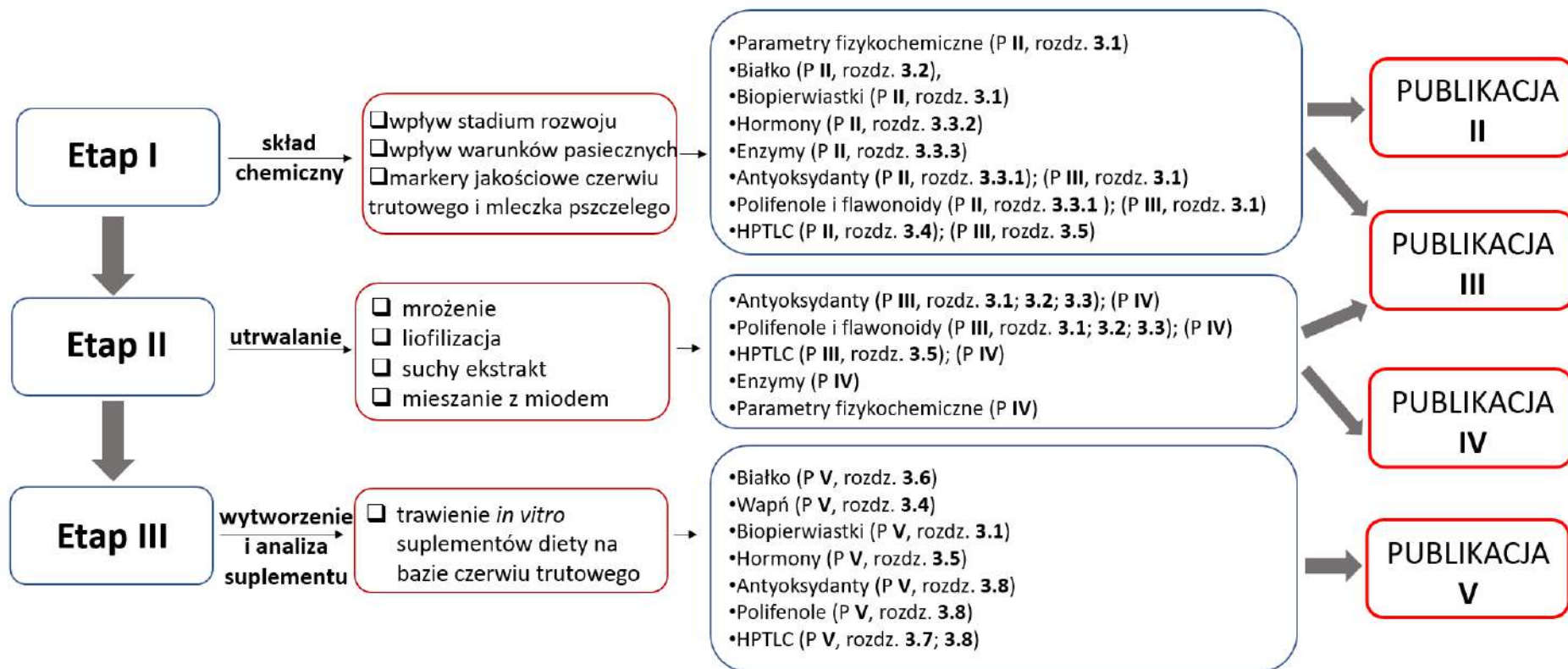
Szczegółowy zakres badań zrealizowanych w każdym etapie przedstawiono na rys. 2.

3.3. Metody badań

Analiza parametrów fizykochemicznych: zawartość wody, współczynnik załamania światła, kwasowość czynną i przewodność mierzono zgodnie z opracowanymi wcześniej procedurami (szczegóły dostępne w **publikacji II** str. 3-4).

Analiza białek: całkowitą zawartość białek wyznaczono analizatorem TrueSpec (LECO, Saint Joseph, MI, USA) bazując na technice Dumasa. Frakcję białek rozpuszczalnych w wodzie oznaczono metodą Bradforda (Latimer 2016). Absorbancję mierzono przy użyciu czytnika mikroplamki (EPOCH 2, BioTek, Winooski, VT, USA). Profil białkowy wyznaczono metodą elektroforezy w warunkach denaturujących SDS-PAGE we współpracy z dr hab. Aleksandrą Bocian, prof. PRz z Wydziału Chemii Politechniki Rzeszowskiej.

Analiza biopierwiastków: zawartość mikro-, makroelementów i metali toksycznych w badanym materiale analizowano metodą spektrometrii optycznej z plazmą indukowaną (ICP-OES) przy użyciu spektrofotometru Thermo iCAP 6500 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) z uprzednią mineralizacją mikrofalową.



Rysunek 2. Zakres badań zrealizowanych w każdym etapie realizacji pracy doktorskiej.

Analiza zawartości hormonów: zawartość hormonów: estradiolu i testosteronu oznaczono według instrukcji producenta dołączonej do testów ELISA (kit do oznaczenia estradiolu: abx574169, testosteronu: abx574314). Absorbancje mierzono przy użyciu czytnika mikroplacytek (EPOCH 2, BioTek, Winooski, VT, USA).

Analiza aktywności antyoksydacyjnej, zawartości związków polifenolowych i flawonoidów: do oceny potencjału antyoksydacyjnego wykorzystano metodę DPPH, ABTS oraz FRAP (Dżugan i in. 2018). Całkowitą zawartość związków polifenolowych oceniano metodą Folina-Ciocalteu (Dżugan i in. 2018). Zawartość flawonoidów badano metodą spektrofotometryczną stosując 2% chlorek glinu w metanolu. (Sidor i in. 2021a). Wyniki obliczono na podstawie równania krzywych kalibracyjnych sporządzonych dla każdej z metod.

Analiza aktywności enzymatycznej: aktywność enzymów glikolitycznych: N-acetylo-D-heksozoaminidazy (HEX), α -galaktozydazy, (α -GAL), β -galaktozydazy (β -GAL), α -mannozydazy (α -MAN), β -mannozydazy (β -MAN), α -glukozydazy (α -GLU), β -glukozydazy (β -GLU), analizowano metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem p-nitrofenolowych substratów (Barett i Heath 1977; Droba i in. 2014, 2016). Wyniki wyrażono w jednostkach enzymatycznych U (μ M/100 g/min). Aktywność α -amylazy badano metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem tabletek Phadebas Diastase test wg instrukcji producenta (Magle AB, Lund, Szwecja).

Analiza profilu polifenolowego, aminokwasowego i cukrowego metoda wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC): analiza porównawcza profili polifenolowych, cukrowych i aminokwasowych wykonano wykorzystując zestaw chromatograficzny firmy CAMAG (Szwajcaria), w którego skład wchodzi półautomatyczny aplikator do nanoszenia próbek, komora rozwijająca, wizualizer do obrazowania chromatogramów, derywatyzer do wywoływania próbek, skaner do detekcji chromatogramów oraz oprogramowanie do analizy ilościowej i jakościowej otrzymanych chromatogramów. Sposób prowadzenia rozdzielania opisano szczegółowo w publikacjach II - V.

Badanie biodostępności wybranych składników z wykorzystaniem modelu trawienia żołądkowo-jelitowego *in vitro*: do oceny biodostępności składników suplementu

zastosowano symulowane trawienie *in vitro* w warunkach laboratoryjnych. Analizę wybranych składników czerwii trutowego we frakcjach z trawienia (żołądkowa, jelitowa) oraz frakcji niepoddanej trawieniu (kontrola) przeprowadzono według wcześniej stosowanej procedury (Vitali i in. 2009). Do oceny zawartości rozpuszczalnego wapnia zastosowano kolorymetryczny zestaw testowy do oznaczania wapnia (ab102505). Wyniki obliczono zgodnie z równaniem krzywej kalibracyjnej sporządzonej dla wzorca wapnia dołączonego do zestawu.

Biodostępność BI [%] obliczono według równania:

$$BI [\%] = (B_{\text{strawiona}} / B_{\text{kontrola}}) \times 100$$

gdzie $B_{\text{strawiona}}$ – stężenie związków we frakcji strawionej (w żołądku/jelicie); B_{kontrola} – stężenie próbki kontrolnej (nie poddanej trawieniu).

Strawność białka rozpuszczalnego obliczono przy użyciu tego samego wzoru. Przyjęto, że otrzymany wynik dla frakcji żołądkowych i jelitowych odpowiadał niestrawionym białkom.

Analiza statystyczna: w przeprowadzonych badaniach do prostej analizy porównawczej wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji testem Tukey'a, przyjmując za poziom istotności $p \leq 0,05$. Analizując wpływ dwóch czynników na zmianę parametrów jakościowych wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji (test NIR Fishera), przyjmując poziom istotności $p \leq 0,05$. Zależności między określonymi parametrami weryfikowano za pomocą analizy głównych składowych (PCA). Korelacje między uzyskanymi parametrami analizowano za pomocą współczynnika r-Pearsona. Przeprowadzono wielokierunkową analizę wariancji testem (Wilksa) w celu ustalenia wpływu i siły niezależnych czynników, przy poziomie istotności $p \leq 0,05$. Wszystkie obliczenia statystyczne wykonano w programie Statistica 13.3.

Metody analityczne wykorzystane do przeprowadzenia analiz w poszczególnych etapach doświadczenia zestawiono w tab. 1.

Tabela 1. Metody analityczne wykorzystane do przeprowadzenia analiz w poszczególnych etapach doświadczenia (**publikacja II, III, IV, V**).

Analizowany składnik	Metoda/technika	Etap I	Etap II	Etap III
Parametry fizykochemiczne	Refraktometryczna (współczynnik załamania światła)	+	+	
	Wagowa (zawartość wody)	+		
	Konduktometryczna (przewodność właściwa)	+	+	
	Miareczkowa (kwasowość)	+	+	
	Potencjometryczna (pH)	+	+	
Białka i aminokwasy	Dumasa (białko ogólne)	+		
	Bradforda (białko rozpuszczalne)	+		+
	SDS-PAGE (profil białkowy)	+		+
	HPTLC (profil aminokwasowy)	+		+
Biopierwiastki	ICP-OES (profil mineralny)	+		+
	test Ca			+
Hormony	Test Elisa (testosteron)	+		+
	Test Elisa (estradiol)	+		+
Potencjał antyoksydacyjny	DPPH	+	+	+
	FRAP	+	+	+
	ABTS	+		
Związki polifenolowe	Folina-Ciocalteu (polifenole ogółem)	+	+	+
	HPTLC (profil polifenolowy)	+	+	+
Enzymy	Test Phadebas (diastaza)	+	+	
	Kolorymetryczna (glikozydazy)	+		
Cukry	HPTLC (profil cukrowy)	+		

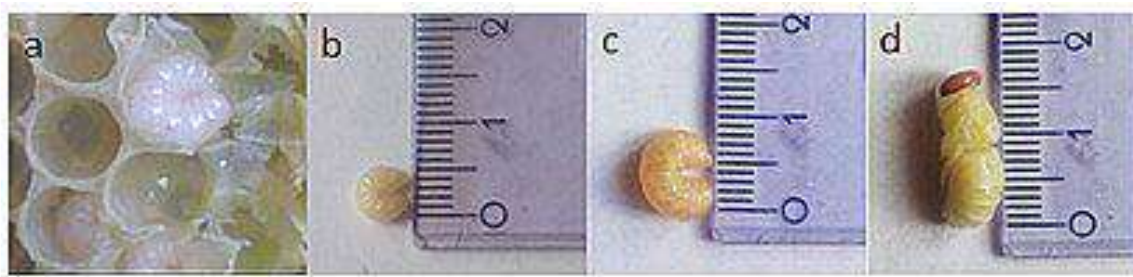
4. Omówienie wyników i dyskusja

4.1. Aktywność biologiczna czerwiu trutowego

Dostępne badania zagraniczne dotyczące składu chemicznego i aktywności biologicznej czerwiu trutowego wskazują na wysoką zawartość składników odżywczych, biopierwiastków i hormonów płciowych. Analizy zwykle obejmowały jednak czerw bez precyzyjnego określenia stadium rozwoju (wieku). Dlatego podjęte badania miały pozwolić na analizę porównawczą składu czerwiu krajowego, a przede wszystkim ustalić stadium rozwojowe czerwiu o maksymalnej zawartości składników bioaktywnych (**publikacja II i III**).

4.1.1. Wpływ stadium rozwoju czerwiu na zawartość składników bioaktywnych

Dla stosowania czerwiu w celach terapeutycznych kluczowe jest ustalenie wieku larw o maksymalnej bioaktywności. Przegląd danych dotyczących pozyskiwania czerwiu trutowego w optymalnej fazie do przerobu technologicznego (6-14 dzień) przedstawiono w **publikacji I**. Bazując na tych ustaleniach, w I etapie prowadzonych badań analizowano skład chemiczny czerwiu trutowego pozyskanego w różnych stadiach rozwoju (7-, 11-, 14 dzień), z 3 pasiek zlokalizowanych na terenie województwa podkarpackiego. Analizie poddano łącznie 9 próbek czerwiu trutowego, a oznaczenia wykonywano w trzech niezależnych powtórzeniach. Wyniki zostały wykorzystane do przygotowania **publikacji II i III**. Na fot. 1 przedstawiono poglądowy rozmiar czerwiu trutowego w różnych etapach rozwoju.

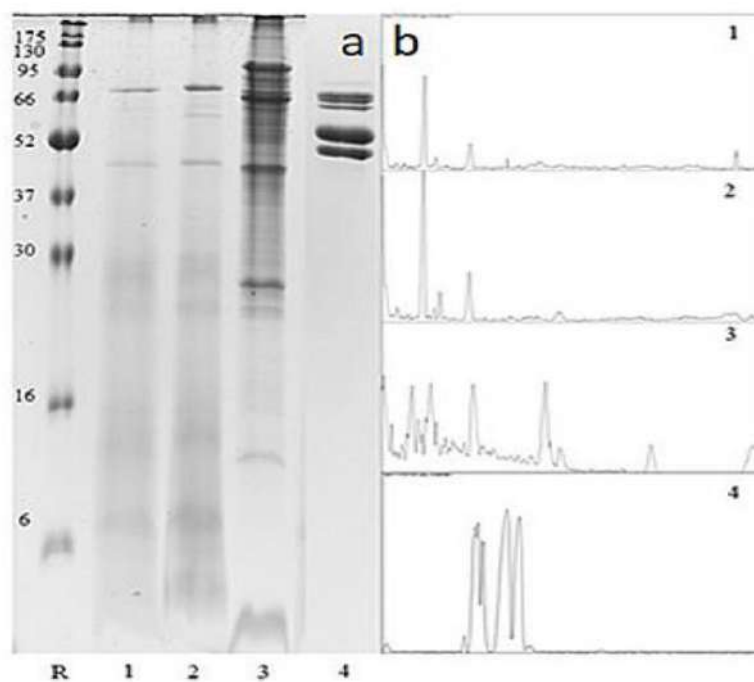


Fotografia 1. Poglądowy rozmiar czerwiu trutowego w różnych etapach rozwoju licząc od dnia złożenia jaja (1 dzień): (a) 7-dniowy czerw w komórce plastra, (b) larwa 7-dniowa, (c) larwa 11-dniowa, (d) 17-dniowa poczwarka (**publikacja II**, wg fig. 1).

Zawartość białka ogólnego i profil białkowy

Stadium rozwoju czerwiu trutowego nie wpływało w sposób istotny na zawartość białka całkowitego oznaczonego metodą Dumasa, natomiast istotnie ($p < 0,05$) wyższą zawartość białka rozpuszczalnego oznaczonego metodą Bradforda wykazano dla 11 i 14-dniowego czerwiu trutowego w porównaniu do 7-dniowych larw (**publikacja II**, tab. 3).

Analiza profilu białkowego metodą SDS-PAGE (rys. 3), wykazała duże zróżnicowanie w zależności od wieku czerwiu. W miarę rozwoju stadium czerwiu obserwowano wzrost liczby i intensywności prążków białkowych. Dla 14-dniowego czerwiu trutowego stwierdzono występowanie licznych białek o masach w zakresie 120-45 kDa oraz dodatkowe białko o masie 8 kDa (**publikacja II**).

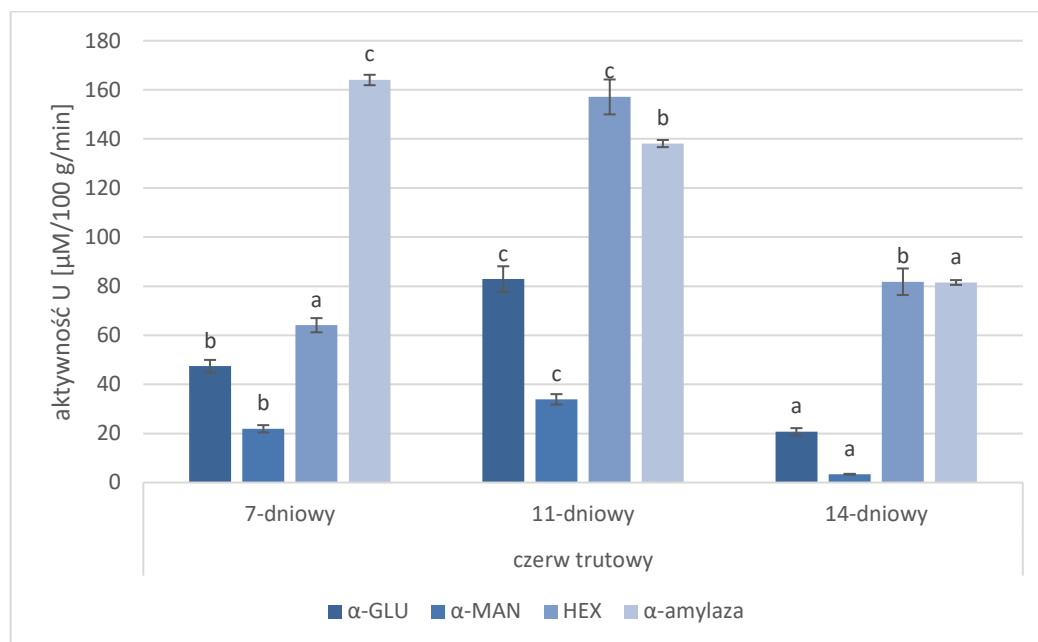


Rysunek 3. (a) Żele po białkowej elektroforezie SDS-PAGE czerwiu trutowego w różnym stadium rozwoju oraz mleczka pszczelego; (b) wykresy liniowe odpowiednich linii żelu wygenerowane za pomocą oprogramowania ImageJ (1.52a); (R) - marker masy cząsteczkowej białka (kDa) (**publikacja II**, fig.2).

Aktywność enzymów glikolitycznych

Po raz pierwszy przeprowadzono analizę aktywności enzymów hydrolitycznych (8 glikozydaz i 2 fosfatazy) w homogenacie czerwiu trutowego w zależności od fazy rozwoju (**publikacja II**). W ekstraktach stwierdzono aktywność wszystkich 10-ciu

badanych enzymów, szczególnie wysoką dla α -glukozydazy (α -GLU), i hexozaminidazy (HEX) (wykres 1).



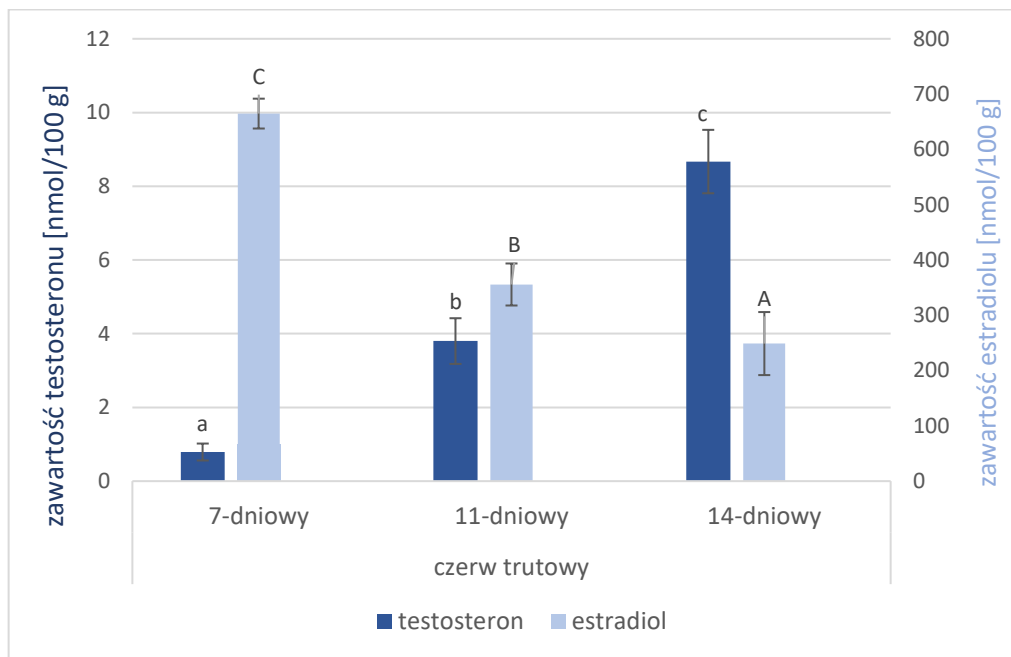
Wykres 1. Aktywność enzymatyczna czerwiu trutowego (publikacja II, wg tab. 5). a,b,c – dane oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie $p < 0,05$ (test Tukey'a)

Szczyt aktywności większości badanych enzymów stwierdzono dla 11-dniowego czerwiu trutowego. Wyjątek stanowiła α -amylaza, która wykazywała najwyższą aktywność w 7 dniowym homogenacie, ulegając obniżeniu w kolejnych fazach ($p < 0,05$). Zmiany aktywności enzymów mogą być uwarunkowane dostępnością pokarmu, którego skład jest dostosowany do wieku larw. Podczas rozwoju ontogenetycznego czerw trutowy jest karmiony mleczkiem pszczelim wzbogaconym o pyłek kwiatowy (Czekońska i in. 2015). Po wygryzieniu trutnie przez pierwsze 6 dni są karmione przez robotnice pokarmem bogatym w białko i aminokwasy, natomiast od 7 dnia po wygryzieniu - miodem bogatym w węglowodany (Czekońska i in. 2015). Ponadto, mleczko pszczele wykazuje wysoką aktywność kwaśnych glikozydaz, które mogą być dostarczane do czerwiu trutowego wraz z pokarmem (Collazo i in. 2021). Po zasklepieniu czerw nie jest dokarmiany, co może być przyczyną późniejszego spadku aktywności badanych enzymów.

Zawartość hormonów płciowych

Badania zmian zawartości hormonów steroidowych podczas rozwoju czerwiu przeprowadzono z wykorzystaniem testów ELISA, dedykowanych do materiałów

biologicznych (**publikacja II**). Wykazano, że czerw trutowy jest obfitym źródłem obu badanych hormonów: testosteronu i estradiolu (wykres 2). Zawartość testosteronu zwiększała się istotnie wraz z rozwojem czerwiu, przy czym 14-dniowy homogenat zawierał odpowiednio o 57% i 92% więcej testosteronu w porównaniu do 11- i 7-dniowego homogenatu. Odwrotną zależność wykazano badając poziom estradiolu, który malał w kolejnych fazach rozwoju: w 14- dniu rozwoju stężenie było o 63% niższe w porównaniu z 7-dniowym czerwem.



Wykres 2. Porównanie zawartości hormonów w czerwiu trutowym w zależności od stadium rozwoju (**publikacja II**, wg tab. 4). Objaśnienia: ^{a,b,c} – dane oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie dla testosteronu $p < 0,05$ (test Tukey'a); ^{A,B,C} – dane oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie dla estradiolu $p < 0,05$ (test Tukey'a).

Uzyskane wyniki poziomu hormonów w czerwiu trutowym (we wczesnej fazie rozwoju) są porównywalne z wynikami przedstawionymi przez Bogdanowa (2012), według którego homogenat czerwiu (bez precyzowania wieku) zawiera: 0,31 nmol/100g testosteronu, 51,3 nmol/100 progesteronu g, 410,65 nmol/100 g prolaktyny, 677,6 nmol/100 g estradiolu i jest bogatszym źródłem hormonów niż mleczko pszczele, które zawiera 0,20 nmol/100 g testosteronu i 52,0 nmol/100 g estradiolu. Kędzia i Hołderna Kędzia (2017) cytując pracę Budnikovej (2009) podają, że w larwach 5-6 dniowych poziom testosteronu wynosi 8,2 nmol/l, natomiast w poczwarkach 15,6 nmol/l. Z kolei poziom estradiolu wraz z postępem rozwoju spada, i tak w 5-6 dniowych larwach wynosi 2745,0 nmol/l, natomiast w poczwarkach 343,5

nmol/l. Autorzy nie podają jednak precyzyjnego wieku poczwerek, a manuskrypt pracy doktorskiej Budnikovej (2009) jest niedostępny. Z kolei Yucel i in. (2019) analizowali zawartość hormonów sterydowych w liofilizowanym czerwiu trutowym i wykazali 4,12 ng/g estradiolu oraz 14.80 ng/g testosteronu, a ponadto 1,20 ng/g prolaktyny i 14,40 ng/g progesteronu.

Aktywność antyoksydacyjna

Potencjał antyoksydacyjny czerwiu trutowego z rodzin pszczelich *Apis mellifera carnica* w trzech różnych stadiach rozwoju: 7-, 11- i 14-dniowym badano z wykorzystaniem standardowych metod kolorymetrycznych (DPPH, ABTS, FRAP), opartych na odmiennych mechanizmach (tab. 2). Zastosowanie dwóch różnych ekstraktów (wodny i w 70% etanolu) miało na celu określenie udziału frakcji hydrofilowych i hydrofobowych przeciwutleniaczy występujących w czerwiu.

Tabela 2. Porównanie zawartości hormonów w czerwiu trutowym w zależności od stadium rozwoju (**publikacja III**, wg tab. 1).

		DPPH [%] średnia ± SD	ABTS [%] średnia ± SD	FRAP [mmolTE/100g] średnia ± SD
7-dniowy	wodny	14,2±2,2 ^a	12,7±4,9 ^b	1,0±0,1 ^a
	70% et.OH	4,3±2,2 ^A	20,4±1,0 ^A	0,5±0,1 ^A
11-dniowy	wodny	20,1±6,7 ^b	6,3±3,9 ^a	1,1±0,2 ^a
	70% et.OH	4,0±0,6 ^B	21,0±4,3 ^A	0,5±0,0 ^A
14-dniowy	wodny	14,7±3,0 ^a	11,6±4,2 ^b	0,9±0,1 ^a
	70% et.OH	3,0±0,3 ^A	20,7±4,1 ^A	0,5±0,0 ^A

Objaśnienia: ^{a,b} – średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się istotnie przy p<0,05 (test NIR Fishera); ^{A,B} – średnie oznaczone różnymi literami w kolumnie różnią się istotnie przy p<0,05 (test NIR Fishera).

Wśród przebadanych ekstraktów wodnych mrożonego czerwiu trutowego, najwyższą aktywność przeciwrodnikową wyznaczoną testem DPPH, stwierdzono dla 11-dniowego czerwiu trutowego (p<0,05), natomiast wyniki dla czerwiu 7- i 14-dniowego nie różniły się istotnie. Wykazano istotnie niższą aktywność ekstraktów etanolowych w porównaniu do wodnych. Analogiczną zależność stwierdzono analizując zdolność redukcyjną wodnych ekstraktów metodą FRAP, a odwrotną zależność zaobserwowano stosując metodę ABTS, gdzie większy potencjał antyoksydacyjny wykazano dla ekstraktów etanolowych (**publikacja III**, tab. 1). Wyższa aktywność ekstraktów wodnych w porównaniu do etanolowych wskazuje, że

dominującą frakcją antyoksydantów czerwii stanowią przeciwutleniacze hydrofilowe. Zaliczają się do nich białka (w tym enzymy), witaminy i polifenole rozpuszczalne w wodzie. Odmienne wyniki uzyskane w metodzie ABTS mogą być związane z występowaniem w czerwii nienasyconych kwasów tłuszczowych (specyficzny kwas decenowy) oraz hydrofobowych polifenoli (Czerkasowa i Prokhoda 2006; Burmistrova 1999), które mogą być bardziej aktywne w zmiataniu kationorodnika ABTS, nie można jednak wykluczyć wpływu innych czynników (Arts i in. 2004; Liang i Kitts 2014; Stagos i in. 2018). Ghosh i in. (2020) analizowali potencjał antyoksydacyjny ekstraktów czerwii liofilizowanego (w 95% etanolu) w różnym stadium rozwoju i wykazali potencjał w zakresie 0,3-18,5 % dla testu DPPH i 10,4-40,1% w przypadku testu ABTS, co potwierdza obserwacje własne, gdzie dla ekstraktów etanolowych (70%) wyniki testu DPPH wynosiły 3,0-4,3%, a dla testu ABTS 20,4-21,0% (**publikacja III**, tab.1).

Zawartość związków polifenolowych i flawonoidów czerwii trutowego

W przypadku zawartości związków polifenolowych najwyższą zawartość wykazano dla czerwii trutowego we wczesnym stadium rozwoju, która malała wraz z rozwojem, natomiast zawartość flawonoidów analogicznie jak w przypadku antyoksydantów była najwyższa w 11-dniowym czerwii trutowym (**publikacja II**, tab. 4). Przedstawione wyniki zawartości polifenoli były podobne do tych otrzymanych przez Sawczuk i in. (2022) 61-323 mgGAE/100 g. Wiadomo, że związki fenolowe kształtują właściwości przeciwutleniające próbek biologicznych, a czerw trutowy jest obfitym źródłem tych związków w porównaniu z innymi produktami pszczelimi (Majewska i in. 2016; Bakchiche i in. 2017; Cornara i in. 2017; Dżugan i in. 2018).

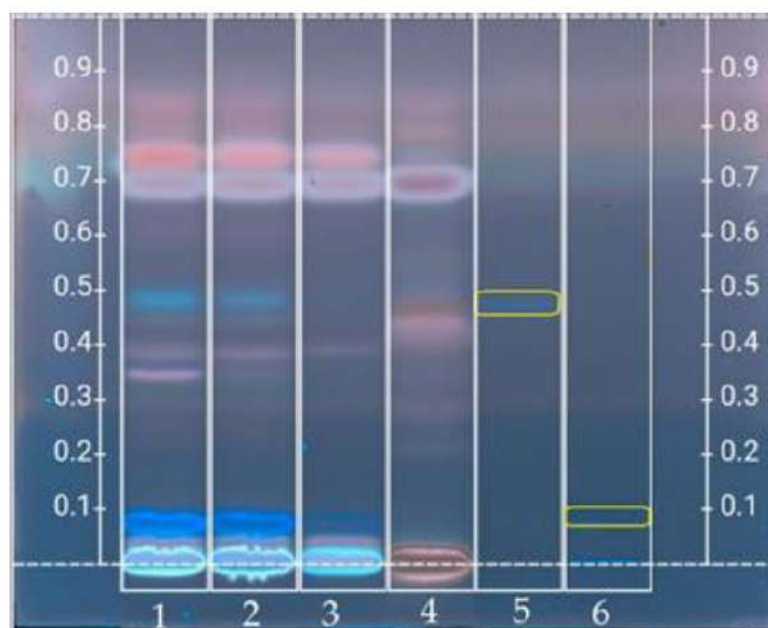
Profil polifenolowy, cukrowy i aminokwasowy czerwii trutowego z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cienkwarstwowej HPTLC

Czerw trutowy był charakteryzowany technikami chromatograficznymi pod względem profilu aminokwasowego i cukrowego metodą GC-MS (Isidorov 2016), poziomu kwasu askorbinowego metodą HPLC/DAD/UV, a koenzymu Q10 i α -tokoferolu metodą HPLC/MS/MS (Sawczuk i in. 2022). W badaniach własnych po raz pierwszy analizowano związki polifenolowe czerwii z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cienkwarstwowej (ang. *high performance thin layer chromatography* HPTLC), która jest zaawansowaną wersją chromatografii cienkwarstwowej (TLC). Ta

technika analityczna pozwala na równoczesną analizę wielu próbek (max. 20), co znacznie usprawnia i skraca czas analizy porównawczej. Chromatografia HPTLC jest szczególnie przydatna w przypadku analizy próbek nietrwałych, które muszą zostać poddane analizie w krótkim czasie. Z uwagi na małą stabilność czerwiu trutowego, analizy HPTLC uznano za najkorzystniejsze narzędzie analityczne do porównywania profili jakościowych związków polifenolowych (**publikacja II i III, IV, V**), cukrów (**publikacja II**) i aminokwasów (**publikacja II, V**) dla ekstraktów czerwiu trutowego w różnym stadium rozwoju.

Profil polifenolowy

Profil polifenolowy czerwiu trutowego wygenerowany z wykorzystaniem systemu CAMAG (LPP Equipment AG, Szwajcaria) uzyskano po raz pierwszy (rys. 4). Stwierdzono zróżnicowanie chromatogramów pod względem umiejscowienia prążków, ich barwy i intensywności, co wskazuje na różnice jakościowe i ilościowe w profilu analizowanych próbek czerwiu trutowego. Identyfikację poszczególnych związków oparto na porównaniu wartości R_f (współczynnika opóźnienia) barwnych prążków wygenerowanych na chromatogramie (uwzględniając ich barwę i intensywność) do R_f substancji wzorcowych specyficznych dla określonego związku polifenolowego. Uzyskany chromatogram pozwolił zidentyfikować unikalne fingerprinty czerwiu trutowego w różnym stadium rozwoju.



Rysunek 4. Chromatogram HPTLC związków fenolowych przy 365 nm (po derywatywacji p-anizaldehydem) w czerwiu trutowym i mleczku pszczelim, gdzie (1) 7-dniowy czerw trutowy;

(2) 11-dniowy czerw trutowy; (3) 14-dniowy czerw trutowy; (4) mleczko pszczele; (5) kwas ferulowy; (6) kwas elagowy (**publikacja II**, fig. 5)

Profil polifenolowy czerwiu zawierał stałe elementy - niebieskie prążki charakterystyczne dla kwasu kawowego, p-kumarowego, elagowego ($R_f = 0,08$) i ferulowego ($R_f = 0,48$). Najwyższą zawartość tych związków (największa intensywność pasm) stwierdzono dla czerwiu 7-dniowego (pasmo 1), a najniższą dla 14-dniowego (pasmo 3). Ponadto „najmłodszy czerw” zawierał dodatkowe białe prążki ($R_f = 0,39$ i $0,34$), nieobecne w późniejszych fazach rozwoju. Badając wpływ pochodzenia pasiecznego czerwiu na profil polifenolowy HPTLC (**publikacja III**, fig. 4) potwierdzono występowanie zidentyfikowanych uprzednio kwasów fenolowych oraz flawonoidów (głównie apigeniny). W **publikacji III** zastosowano unikalną metodę wybarwienia płytki odczynnikiem DPPH, co pozwoliło dodatkowo wykazać właściwości przeciwutleniające polifenoli występujących w czerwiu (**publikacja III**, fig. 5).

Wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa cieszy się coraz większą popularnością ze względu na możliwość analizy wielu próbek różnego pochodzenia w tym samym czasie, np. kwasu 10-hydroksy-2-decenowego dla produktów pszczelich (Korany i in. 2020), profilu cukrowego w miodzie (Islam i in. 2020) oraz profilu związków fenolowych w pyłku pszczelim (Mosic i in. 2019). Jednak do tej pory technika ta nie była stosowana do analizy czerwiu trutowego. Zgodnie z literaturą wszystkie produkty pszczele uważane są za potencjalne źródło naturalnych przeciwutleniaczy (Kocot i in. 2018; Martinello i Mutinelli 2021). W badaniach własnych wykazano, że również czerw trutowy, wykazuje silne właściwości antyoksydacyjne.

Profil cukrowy

Metodą HPTLC analizowano zmiany w profilu cukrowym czerwiu trutowego w zależności od stadium rozwoju (**publikacja II**, fig. 6). Badania nie wykazały zmian jakościowych w analizowanych profilach cukrowych, w których dominowały cukry proste (glukoza i fruktoza) i być może trehaloza, jednak jej identyfikacja nie była jednoznaczna. W oparciu o intensywność barwy prążków wykazano zmienną zawartość poszczególnych cukrów w ekstrakcie czerwiu związaną z fazą rozwoju.

Profil aminokwasowy

Techniką HPTLC wykazano również zmienność profilu aminokwasowego homogenatu czerwiu trutowego w kolejnych fazach rozwojowych, przy czym były to raczej różnice ilościowe niż jakościowe (**publikacja II**, fig. 7). Niezależnie od stadium rozwoju zidentyfikowano główne pasma przy R_f w zakresie 0,01-0,30, odpowiadające prolinie, glicynie, lizynie, tyrozynie (lub leucynie) i walinie. Dla 14-dniowego homogenatu stwierdzono niższą zawartość aminokwasów, o czym świadczy mniej intensywne barwienie prążków. Takie analizy czerwiu trutowego z wykorzystaniem techniki HPTLC były prowadzone po raz pierwszy. Uzyskane profile są jednak porównywalne z wynikami Margaoan i in. (2017), którzy analizowali profil aminokwasowy larw pszczelich i matecznych techniką chromatografii cieczowej LC-MS oraz Isidorova i in. (2016), którzy analizowali profil aminokwasowy larw trutowych techniką chromatografii gazowej GC-MS.

4.1.2. Wpływ warunków pasiecznych na aktywność antyoksydacyjną czerwiu trutowego

W celu zweryfikowania czy *aktywność biologiczna czerwiu zależy od warunków hodowli i stanu rodziny pszczelej?* zaprojektowano doświadczenie polegające na porównaniu jakości czerwiu w tej samej fazie rozwoju pozyskanego w tym samym terminie w 3 różnych pasiekach oddalonych od siebie co najmniej o 50 km. Do oceny zastosowano łatwe do wyznaczenia parametry tj. potencjał antyoksydacyjny (DPPH, ABTS, FRAP), całkowitą zawartość polifenoli (TPC) i flawonoidów (TFC). Do badań wykorzystano ekstrakty wodne i etanolowe mrożonego czerwiu trutowego (**publikacja III**, tab. 1).

Analizy wykazały, że warunki pasieczne istotnie wpływały na aktywność antyoksydacyjną czerwiu mierzoną testem DPPH ($p < 0,05$). Taką samą zależność stwierdzono analizując wyniki potencjału antyoksydacyjnego uzyskanego metodami ABTS i FRAP, całkowitą zawartość związków polifenolowych i flawonoidów. Z kolei Sawczuk i in. (2022) analizowali potencjał antyoksydacyjny (DPPH) i całkowitą zawartość polifenoli (metodą Folina Ciocalteu) liofilizowanego czerwiu trutowego w zależności od stadium rozwoju oraz lokalizacji pasiek (wiejskie, miejskie, podmiejskie), rasy pszczół (*carnica*, *buckfast*), sezonu zbioru (wiosna, lato, jesień, rok zbioru 2016-2018). Autorzy wykazali, że uzyskane wyniki różnią się istotnie

w zależności od większości analizowanych czynników, jedynie w przypadku lokalizacji pasiek nie stwierdzono istotnych różnic, chociaż najlepsze parametry wykazywał czerw z terenów wiejskich ($p > 0,05$). Autorzy badając całkowitą zawartość związków polifenolowych stwierdzili zmienność uzależnioną od stadium rozwoju, im młodsze stadium rozwoju tym wyższa zawartość. Przytoczone dane potwierdzają obserwacje własne, że aktywność antyoksydacyjna czerw trutowego jest związana nie tylko ze stadium rozwoju, ale także z warunkami pasiecznymi, w których odbywa się rozwój larw trutowych.

4.1.3. Różnice w składzie czerw trutowego i mlecza pszczelego

Czerw trutowy wykazuje silne właściwości antyoksydacyjne, a ze względu na duże podobieństwo do mlecza pszczelego, często nazywany jest jego męskim odpowiednikiem (Wang i in. 2016; Bałkańska i in. 2014; Cornara i in. 2017). Homogenat czerw trutowego i mlecza pszczelego to produkty pszczele o bardzo zbliżonych cechach sensorycznych. Oba pochodzą z ula, mają podobną barwę, konsystencję oraz parametry fizykochemiczne, co jest wykorzystywane w celu fałszowania mlecza pszczelego czerwem trutowym, który jest łatwiej dostępnym produktem pszczelim. Dlatego podjęto próbę ustalenia markerów chemicznych, łatwych do oznaczenia, które pozwoliłyby jednoznacznie rozróżnić te dwa produkty pszczele i identyfikować zafałszowanie mlecza (**publikacja II**).

Analizując parametry fizykochemiczne tj. zawartość wody, pH i kwasowość, oraz przewodnictwo i współczynnik załamania światła dla obu badanych produktów pszczelich nie stwierdzono istotnych różnic (tab. 3). Uzyskane wyniki były zgodne z przedstawionymi wcześniej wynikami badań prowadzonymi przez Bałkańską i in. (2014), Barnuti i in. (2013), Wytrychowskiego i in. (2013) oraz Kolayli i in. (2016), Krella (1996), Ramadana i Al-Ghamdi (2012) i Nabasa i in. (2014). Oba badane produkty pszczele wykazywały właściwości przeciwutleniające, jednak czerw trutowy był bardziej aktywny niż mleczo pszczele, zwłaszcza w teście FRAP. Porównując dane przedstawione przez innych autorów dla mlecza pszczelego (Wang i in. 2016; Cornara i in. 2017; Bałkańska i in. 2017) można uznać, że potencjał antyoksydacyjny czerw trutowego jest korzystniejszy niż mlecza pszczelego.

Zarówno czerw jak i mleczko pszczele stanowią obfite źródło makro – i mikroelementów, zawierają porównywalny poziom Na, K, Ca, Mg, Cu, wyjątek stanowi żelazo obecne wyłącznie w czerwiu oraz mangan, którego 5-krotnie większą zawartość stwierdzono w czerwiu (**publikacja II**, tab. 2).

Tabela 3. Wyróżniki jakościowe czerwiu trutowego i mleczka pszczelego (**publikacja II**, (tab. 2,3,4,5).

	czerw trutowy średnia (n=9) (min-max dla czerwiu 7, 11 i 14 dniowy]	mleczko pszczele średnia (n=3) (min-max)
Parametry fizykochemiczne		
zawartość wody [%]	71,1 (68,7-72,8)	68,4 (65,4-69,0)
pH	6,60* (6,58-6,78)	3,97 (3,97-3,98)
kwasowość [mval/g WW]	14,0* (9,90-19,0)	6,36 (6,30-6,50)
przewodność [mS/cm]	0,03 (0,03-0,04)	0,03 (0,03-0,04)
współczynnik załamania światła [n_D]	1,338 (1,337-1,339)	1,341 (1,340-1,342)
Białko		
Białko całkowite [%]	13,28 (12,99-13,54)	14,12 (10,43-18,14)
Białko rozpuszczalne [%]	4,12* (3,41-4,64)	7,28 (6,88-7,96)
Hormony		
Testosteron [nmol/100 g]	4,42* (0,79-8,67)	0,68 (0,64-0,72)
Estradiol [nmol/100 g]	423,07* (248,78-664,75)	106,46 (94,12-116,03)
Enzymy		
α -GLU [U/g/min]	50,33* (20,70-82,90)	0,70 (0,60-0,90)
α -MAN [U/g/min]	19,73* (3,40-33,90)	1,30 (1,20-1,50)
HEX [U/g/min]	101,0* (64,10-157,10)	4,50 (0,90-8,10)
diastaza [DN]	12,78* (8,15-16,40)	0,56 (0,46-0,64)
Biopierwiastki		
Fe	0,57-1,62* (1,18)	-
Mn	0,06-0,39* (0,24)	0,01-0,08 (0,05)
Antyoksydanty		
DPPH [%]	14,45* (6,91-24,76)	10,52 (7,94-11,03)
FRAP [mmolTE/100 g]	1,01* (0,79-1,63)	0,19 (0,18-0,20)

*dane w wierszu różnią się od siebie istotnie statystycznie (test Tukey'a, $p < 0,05$)

Białka rozpuszczalne w wodzie stanowiły 25–35% całkowitej zawartości białka w czerwiu trutowym, w mleczku pszczelim stanowiły one 50% białka ogólnego. Mleczko zawierało średnio o 43% więcej analizowanego składnika, w porównaniu do czerwiu trutowego. Metodą SDS-PAGE zidentyfikowano białka (prążki) o masie 28 i 12 kDa, specyficzne dla czerwiu trutowego (obecne we wszystkich badanych fazach

rozwojowych), które mogą służyć do odróżnienia obu produktów (**publikacja II**, fig. 2). Wyznaczona zawartość białek ogółem była analogiczna z wynikami przedstawionymi przez innych autorów dla czerwiu trutowego (Iliesiu 1988; Prokhoda i in. 2020) oraz dla mlecza pszczelego (Iliesiu 1988; Sabatini i in. 2009; Ramadan i Al-Ghamdi 2012; Nabas i in. 2014). Szczególnie istotne różnice wykazano w zawartości hormonów, gdzie czerw trutowy zawierał średnio o 297% więcej estradiolu oraz o 550% więcej testosteronu. Jako markery odróżniające oba analizowane produkty pszczele wskazano aktywność trzech glikozydaz (HEX, α -GLU i α -MAN). Podobne obserwacje zanotowano w przypadku aktywności alfa-amylazy, enzymu rozkładającego polisacharydy na cukry proste, gdzie w mleczku pszczelim wykazano jedynie śladową aktywność, podczas gdy w czerwiu trutowym stwierdzono wysoką aktywność tego enzymu na poziomie 12,78 μ M/100 g/min. Prostota i szybkość kolorymetrycznego oznaczenia aktywności tych enzymów z wykorzystaniem syntetycznych substratów, pozwala rekomendować je jako tanie i łatwo dostępne markery pozwalające na detekcję zafałszowania mlecza pszczelego czerwem trutowym. Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w pracy Droby i in. (2014, 2016), którzy stwierdzili wielokrotnie większą i niezwykle zróżnicowaną aktywność enzymatyczną w larwach matek niż w mleczku. Wysoką aktywność kwaśnych glikozydaz, wybranych jako markery, w różnych homogenatach tkankowych wykazano już wcześniej (Dżugan i in. 2011; Dżugan i Lis 2016).

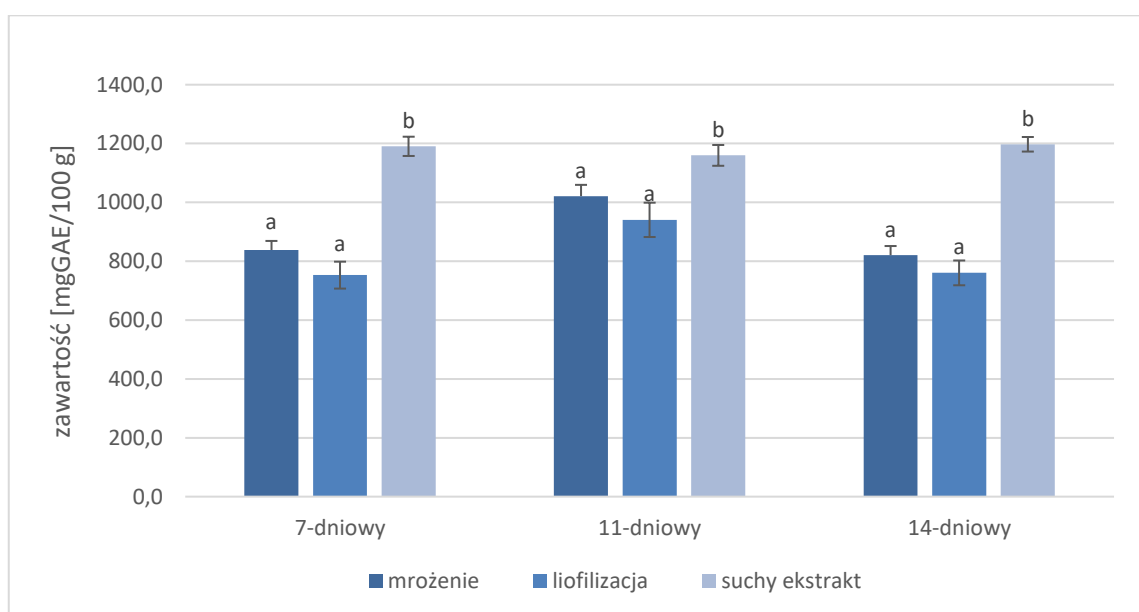
4.3. Utrwalanie czerwiu trutowego

Największą wadą czerwiu trutowego jest jego niska stabilność i konieczność natychmiastowego utrwalenia. Najprostszym sposobem jest mrożenie w temperaturze $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z powodów technicznych nie prowadzono badań świeżego czerwiu, a przyjęto, że czerw krótkotrwale mrożony (do 30 dni) zachowuje pełną aktywność. Czerw mrożony poddano utrwaleniu na drodze liofilizacji, przekształcenia w suchy ekstrakt oraz mieszania z miodem.

4.3.1. Liofilizacja

Metodą liofilizacji uzyskano 2 formy utrwalonego czerwiu: czerw *lioofilizowany* (suszeniu sublimacyjnemu poddano pełny homogenat) i *suchy ekstrakt* (liofilizacji poddano wodny ekstrakt czerwiu, z którego przez wirowanie odseparowano

nierozpuszczalne struktury komórkowe). W **publikacji III** przedstawiono porównanie potencjału antyoksydacyjnego oraz całkowitej zawartości związków polifenolowych (wykres 3) dla czerwii mrożonego, liofilizowanego i suchego ekstraktu w przeliczeniu na suchą masę czerwii trutowego. Wodne ekstrakty mrożonego czerwii trutowego wykazywały najwyższą zawartość badanych związków. Ubytek potencjału antyoksydacyjnego podczas utrwalania metodą liofilizacji wynosił od 6 do 10% (niezależnie od zastosowanej metody badań), a straty związków polifenolowych wynosiły 4-12%. Z kolei dla „suchego ekstraktu” stwierdzono wzrost potencjału antyoksydacyjnego mierzonego metodą DPPH w stosunku do czerwii liofilizowanego o 12,4%, w przypadku metody FRAP wykazano spadek potencjału do 9,3%.



Wykres 3. Porównanie całkowitej zawartości związków polifenolowych w wodnych ekstraktach czerwii trutowego utrwalonego różnymi metodami (**publikacja III**, tab. 2 i 3; dane dla suchego ekstraktu w trakcie publikacji). Objaśnienia: ^{a,b}- średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie w obrębie jednego stadium rozwoju ($p < 0.05$).

Wytworzenie suchego ekstraktu wpłynęło pozytywnie na całkowitą zawartość polifenoli, dla którego wartości były do 36,8% wyższe w porównaniu do liofilizowanego czerwii trutowego. Oczyszczenie suchego ekstraktu z nierozpuszczalnych struktur komórkowych nie tylko zwiększyło jego właściwości antyoksydacyjne, ale poprawiło rozpuszczalność w wodzie, przy stężeniu 7,2 mg/ml dla suchego ekstraktu uzyskiwano roztwór rzeczywisty, a dla liofilizatu zawiesinę, co ułatwia prowadzenie badań toksykologicznych.

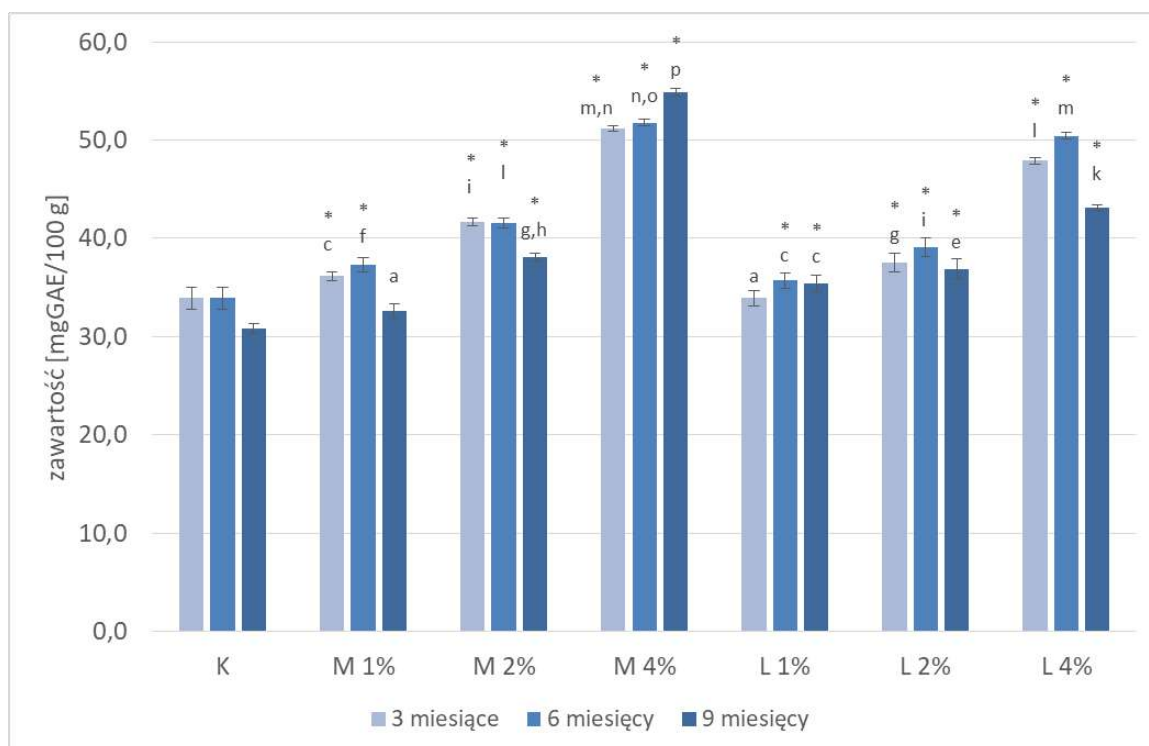
Uzyskane wyniki są porównywalne z doniesieniami innych autorów. Zawartość polifenoli w 7-dniowym czerwiu trutowym po liofilizacji (Apilarnil) badał Silici (2019), który podaje całkowitą zawartość polifenoli w podobnym przedziale 760–940 mg GAE/100 g oraz aktywność antyoksydacyjną mierzoną metodą DPPH ekstraktów wodnych do 81%, jednak procedura przygotowania próbki i rozcieńczenia do analizy różniła się od zastosowanej w **publikacji II**. Utrwalanie metodą suszenia sublimacyjnego pozwala na uzyskanie suchej masy produktu z zachowaniem aktywności surowca (Shofian i in. 2011). Produkt może być przechowywany 24 miesiące, z uwagi na dużą porowatość i higroskopijność w hermetycznym opakowaniu (Ciurzyńska i Lenart 2011). Otrzymane wyniki potwierdziły, że zastosowanie metody liofilizacji do utrwalenia czerwiu trutowego pozwoliło zachować aktywność antyoksydacyjną (straty do 10%) oraz całkowitą zawartość związków fenolowych (o 7–11%).

4.3.2. Utrwalenie w miodzie rzepakowym

Jedną z zalecanych metod utrwalania czerwiu jest mieszanie z miodem (najczęściej 5% dodatek), co ma pozwolić na zachowanie trwałości przez okres 6 miesięcy i, co ważniejsze, umożliwić przechowywanie produktu w temperaturze pokojowej (ułatwienie dystrybucji i transportu). Wpływ utrwalania czerwiu trutowego miodem i stabilność uzyskanego produktu nie był do tej pory szczegółowo badany. Przeprowadzone wcześniej w macierzystej jednostce badania wykazały, że miód rzepakowy w najlepszym stopniu nadaje się do wykorzystania jako środek utrwalający (Miłek i in. 2023; Tomczyk i in. 2019; Sidor i in. 2022) ze względu na dużą dostępność produktu, relatywnie niską cenę oraz zdolność do szybkiej krystalizacji, dzięki czemu idealnie nadaje się do procesu kremowania. Celem omawianego etapu badań było utrwalenie czerwiu trutowego (mrożonego lub liofilizowanego) w miodzie rzepakowym oraz analiza zmian aktywności przeciwutleniającej otrzymanych miodów w czasie przechowywania do 9 miesięcy (**publikacja IV**).

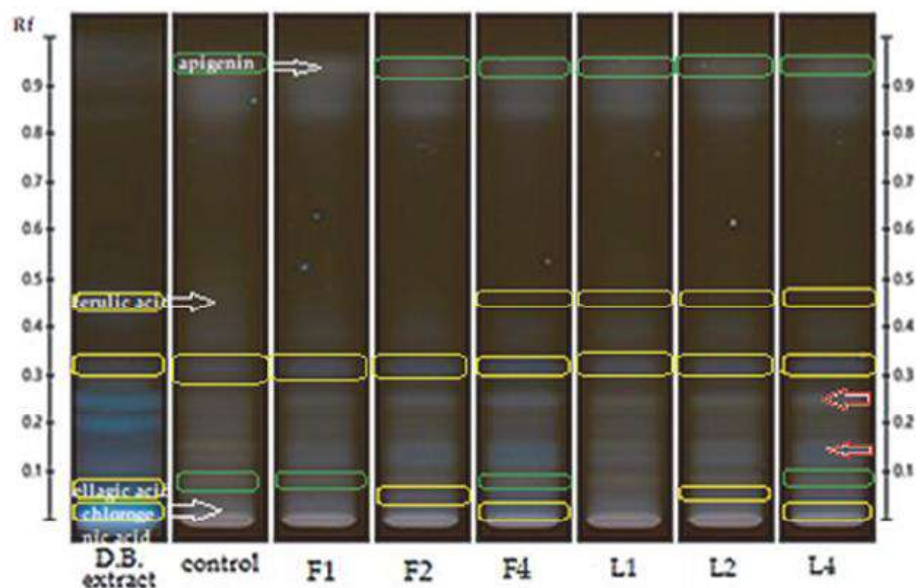
Dodatek czerwiu do miodu nie wpłynął istotnie na parametry fizykochemiczne miodu (**publikacja IV**, tab. 1). Wykazano, że dla najwyższego dodatku czerwiu mrożonego zawartość wody zbliżyła się do wartości 20%, bezpiecznej granicy zabezpieczającej miód przed fermentacją. W tym aspekcie stosowanie dodatku

liofilizowanego jest korzystniejsze dla stabilności produktu. Wprowadzenie czerwiu trutowego do miodu rzepakowego (dodatek 1, 2 i 4%) istotnie zwiększyło zawartość związków polifenolowych. Największy wzrost stwierdzono w przypadku dodatku 4% czerwiu mrożonego, jednak należy zaznaczyć, że wzrost aktywności antyoksydacyjnej nie był wprost proporcjonalny do zwiększania udziału dodatku. Potwierdzono zachowanie pełnej aktywności antyoksydacyjnej miodu z czerwem do 6 miesięcy przechowywania (wykres 4). Wydłużenie czasu przechowywania do 9 miesięcy spowodowało spadek zawartości związków polifenolowych, zależny od formy czerwiu i wysokości dodatku. Jednak miody z dodatkiem czerwiu mrożonego/liofilizowanego wciąż zachowały wyższą aktywność w porównaniu do miodu kontrolnego (**publikacja IV**).



Wykres 4. Zmiana całkowitej zawartości związków polifenolowych podczas przechowywania przez 3, 6 i 9 miesięcy (**publikacja IV**, wg fig. 1c). Objaśnienia: K- miód rzepakowy (kontrola); M 1% - dodatek 1% (w/w) czerwiu mrożonego; M 2% - dodatek 2%; M 4% - dodatek 4%; L 1% - dodatek 1% czerwiu liofilizowanego; L 2% - dodatek 2%; L 4% - dodatek 4%; a, b, c, d, e, f, g - średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($p < 0.05$); * istotnie różne w porównaniu do próby kontrolnej ($p < 0.05$).

Porównanie profilu polifenolowego miodu rzepakowego i ekstraktów czerwiu trutowego metodą HPTLC pozwoliło ustalić specyficzny dla obu produktów zestaw polifenoli (rys. 5).



Rysunek 5. Profile polifenolowe (uzyskane techniką HPTLC) po 9 miesiącach przechowywania mrożonego (F1, F2 i F4) i liofilizowanego (L1, L2 i L4) czerniu trutowego utrwalonego w miodzie. Dla porównania użyto DB - ekstrakt z czerniu trutowego i control - kontrolny miód rzepakowy (**publikacja IV**, fig. 2). Objaśnienia: Na żółto zaznaczono wybrane związki migrujące z ekstraktu czerniu trutowego do miodu, na zielono zaznaczono związki pochodzące z miodu rzepakowego. Czerwona strzałka wskazuje polifenole obecne w miodzie w niewielkiej ilości, których zawartość została zwiększona przez dodanie czerniu trutowego (prążki, które zostały zintensyfikowane).

Dla czerniu trutowego (ścieżka DB extract) zidentyfikowano pasma o Rf w zakresie 0,1-0,9, różniące się wizualnie barwą (jasnoniebieskie, niebieskie), a uzyskany profil był analogiczny jak we wcześniejszych pracach (**publikacja II i III**). W miodach z dodatkiem mrożonego czerniu trutowego (F1, F2, F4) zidentyfikowano kwasy polifenolowe pochodzące z czerniu: chlorogenowy (Rf = 0,03), elagowy (Rf = 0,07), ferulowy (Rf = 0,45), które nie występowały w miodzie rzepakowym. Ich zawartość, zwiększała się wraz z udziałem dodatku, na co wskazuje narastająca intensywność prążków. Podobny obraz obserwowano dla miodów z dodatkiem liofilizatu czerniu. Natomiast specyficzne dla miodu polifenole, obserwowane jako brązowe (Rf = 0,05-0,25) i jasnożółte (Rf > 0,90) oraz pojedyncze, ledwo widoczne jasnożółte i jasnoniebieskie prążki, występowały także w profilu wszystkich miodów wzbogaconych czerniem, niezależnie od formy i udziału dodatku. Uzyskany chromatogram profilu polifenolowego analizowanego miodu rzepakowego był podobny do przedstawionego przez Stanek i Jasicką-Misiak (2018), gdzie wykazano dominujące pasma koloru żółtego, jasnoniebieskiego, niebieskiego i czarnego, wśród

których zidentyfikowano obecność kwasu p-kumarowego, chlorogenowego i mirycetyny.

Wytwarzanie miodów wzbogaconych różnymi dodatkami roślinnymi jest coraz bardziej popularne, a prowadzone badania wskazują na synergistyczne wzmocnienie właściwości antyoksydacyjnych i wzbogacenie profilu polifenolowego (Grabek-Lejko i in. 2022; Miłek i in. 2023). Prezentowane w tej pracy badania potwierdzają analogiczny efekt uzyskany z zastosowaniem dodatku pochodzenia zwierzęcego. Obserwowany synergizm działania miodu i czerwiu trutowego zwiększa działanie prozdrowotne produktu, a równocześnie ze względu na akceptowalne cechy organoleptyczne stanowi wygodną formę wprowadzenia czerwiu do diety. Miód z dodatkiem czerwiu mrożonego może być uznany za wartościowy suplement diety o wysokiej trwałości przechowalniczej, możliwy do wytworzenia w warunkach pasiecznych.

4.4. Możliwości wykorzystania czerwiu trutowego jako suplementu diety

W poprzednich pracach (**publikacja II, III, IV**) wykazano obecność korzystnych związków czerwiu trutowego (hormony, białka, przeciwutleniacze, biopierwiastki). W kolejnym etapie badań zaprojektowano i wytworzono naturalne suplementy diety na bazie czerwiu trutowego w formie kapsułek wygodnych do stosowania:

1. DB – czerw trutowy (300 mg/kapsułkę)
2. DB+ES - czerw trutowy + organiczny wapń (300mg + 250 mg/kapsułkę)
3. DB+CC - czerw trutowy + nieorganiczny wapń (300mg + 250 mg/kapsułkę)

(publikacja V).

Dawka czerwiu trutowego wprowadzona do pojedynczej kapsułki (DB) pozwala osiągnąć maksymalną dobową dawkę leczniczą (3 kapsułki/dobę), którą określono na 900 mg (Kędzia i Hołderna-Kędzia, 2017). Połączenie czerwiu z wapniem w 1 kapsułce pozwoliło uzyskać suplement dedykowany osobom zagrożonym osteoporozą. W celu zapobiegania osteoporozie zaleca się suplementację wapnia (1000-1200 mg/dobę), najlepiej w dawkach podzielonych (Sewerynek i in. 2011). W ostatnich badaniach potwierdzono większą efektywność wapnia organicznego (naturalnego) pochodzącego ze sproszkowanych skorupki jaj w porównaniu z wapniem nieorganicznym (chemicznie czysty węglan wapnia) w łagodzeniu skutków osteoporozy (Sakai i in. 2017; Omelka

i in. 2021). Wykorzystując laboratoryjny model przewodności pokarmowej analizowano biodostępność głównych składników (hormony, wapń, antyoksydanty i polifenole) oraz strawność białka podczas symulowanego trawienia *in vitro* zaprojektowanych suplementów (**publikacja V**).

4.4.1. Analiza biodostępności składników bioaktywnych z zaprojektowanych suplementów na bazie czerwiu trutowego

Biodostępność składników pokarmowych, definiowana jako ilość spożytych składników dostępnych do wchłonięcia w jelicie po strawieniu, jest ważnym wskaźnikiem w ocenie skuteczności stosowania suplementów diety. Takie badania są prowadzone z zastosowaniem modeli umożliwiających ocenę stopnia strawienia i wchłaniania składników pokarmowych w warunkach *in vitro*. Biodostępność zależy od wielu czynników, w tym matrycy organicznej, z której uwalniany jest składnik pokarmowy. W celu określenia biodostępności wybranych składników z zaprojektowanych suplementów diety podjęto badania z zastosowaniem dwustopniowego modelu trawienia żołądek-jelito. Według dostępnej literatury badania takie przeprowadzono po raz pierwszy.

Hormony

Wykazano, że biodostępność hormonów sterydowych zawartych w czerwiu (suplement DB) po zakończeniu trawienia wynosiła 63,3 i 21,3 %, odpowiednio dla testosteronu i estradiolu (wykres 5a). Uwalnianie testosteronu z matrycy obserwowano w fazie żołądkowej i jelitowej, odpowiednio 23,8 i 93,3%, podczas gdy estradiol uwalniał się dopiero w jelicie (21,3%). Dodatek wapnia, istotnie zwiększał biodostępność testosteronu w obydwu frakcjach, przy czym uwalnianie testosteronu z matrycy było istotnie większe w obecności wapnia nieorganicznego (suplement DB+CC) niż organicznego (DB+ES), o 16,2% dla frakcji żołądkowej i 20% dla jelitowej. Obecność wapnia (niezależnie od formy) nie wpływała na uwalnianie estradiolu z suplementu ($p > 0,05$).

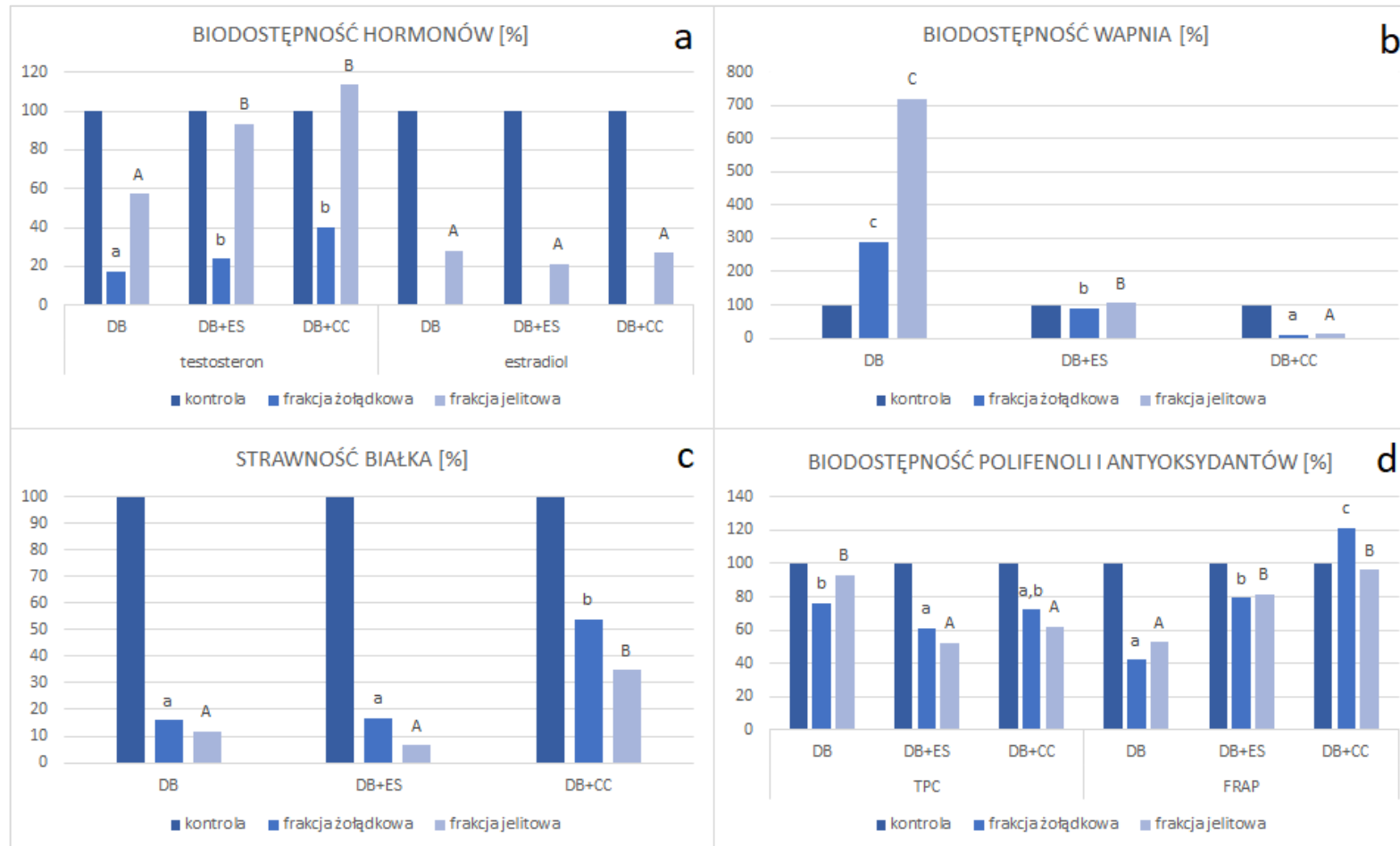
Ze względu na hydrofobowy charakter, obydwa hormony stają się biodostępne dopiero po zemulgowaniu strawionej treści, co następuje w kontakcie z żółcią (Baltaci i in. 2019). Po zemulgowaniu testosteron jest włączany do chylomikronów i wchłaniany

przez limfę (CN106456782B). Biodostępność testosteronu może zależeć także od synergizmu związków występujących w spożywanych pokarmach przez człowieka. Dla przykładu cynk, obecny także w skorupkach jaj (0,44 mg/100 g s.m.), ułatwia uwalnianie i wchłanianie testosteronu (Baltaci i in. 2019).

Wapń

Podczas symulowanego trawienia *in vitro* oceniono biodostępność jonów wapnia z wytworzonych kapsułek (wykres 5b). Naturalna zawartość wapnia w czerwiu trutowym wynosi średnio 19,42 mg/100 g (**publikacja II**, tab. 2), co stanowi 2,57% składników mineralnych. Wykazano wysoki wskaźnik biodostępności wapnia z czystego czerwiu trutowego (DB), głównie w jelicie. Wapń z suplementu na bazie czerwiu i wapnia organicznego (DB+ES) był uwalniany w znacznie większym stopniu (odpowiednio 89,89% i 105,14% w żołądku i jelitach) w porównaniu z suplementem z czerwiu i węglanu wapnia (DB+CC), gdzie biodostępność wapnia wynosiła tylko 10,08% w żołądku i 12,09% w jelitach.

Biodostępność wapnia z suplementów, podobnie jak z pożywienia, zależy od całkowitej ilości jednorazowego spożycia, organizm przyswaja około 36% z dawki 300 mg wapnia i 28% z dawki 1000 mg (Rodriquez-Rodriquez i in. 2020). Ponadto ważne jest źródło wapnia, wapń ze skorupki jaj jest znacznie bardziej dostępny niż syntetyczny węglan wapnia (Kusumi i in. 1999). Ponadto wykazano, że wapń ze skorupki jaj jest skuteczniejszy w porównaniu z węglanem wapnia w zwiększaniu masy kostnej u kobiet, co wskazuje na jego potencjalne zastosowanie jako suplementu wapnia w żywieniu człowieka (Sakai i in. 2017). Podobne wyniki osiągnęli Omelka i in. (2021) w badaniach na modelu zwierzęcym szczurów po resekcji jajników, wykazując, że proszek ze skorupki jaj kurzych skuteczniej łagodzi utratę masy kostnej u zwierząt niż wapń nieorganiczny. Według Ray i in. (2017) biodostępność wapnia z węglanu określono na około 20 – 30%. Ponadto, na biodostępność wapnia ze skorupki jaj może wpływać korzystnie obecność innych minerałów, ważnych dla kondycji kości. Z tego względu skorupki jaj zostały zaproponowane jako dodatek do różnego rodzaju żywności, w celu zwiększenia podaży tego pierwiastka, zwłaszcza w diecie osób narażonych na jego niedobory (Bartter 2018; Kobus-Cisowska 2020).



Wykres 5. Wskaźnik biodostępności [%] (a) hormonów, (b) wapnia, (d) polifenoli i siły redukującej oraz strawność [%]: (c) białka w badanych frakcjach suplementów po trawieniu. Objaśnienia: ^{a,b,c} - wyniki oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie pomiędzy frakcjami żołądkowymi suplementów ($p < 0,05$); ^{A,B,C} - wyniki oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie pomiędzy frakcjami jelitowymi suplementów ($p < 0,05$). (publikacja V, wg fig.2).

Białka i aminokwasy

Spośród wszystkich analizowanych suplementów najwyższą zawartość białka rozpuszczalnego stwierdzono dla kapsułki z czerwem trutowym (DB). Z suplementów z dodatkiem wapnia wyekstrahowano o 50% mniej białek rozpuszczalnych, co wskazuje na interakcje białek czerwiu z jonami wapnia zmniejszającymi rozpuszczalność białek (wykres 5c). Niezależnie od suplementu, białka czerwiu podlegają trawieniu głównie w fazie żołądkowej, w 84,09; 83,13% i 46,03% odpowiednio dla suplementu DB, DB+ES i DB+CC. Podobnie we frakcjach jelitowych, stwierdzono wyższy stopień strawienia białka w kapsułce DB+ES (60,76%) w porównaniu do kapsułki DB+CC (25,15%). Analogiczny obraz wykazano metodą elektroforezy SDS-PAGE (**publikacja V**, fig. 3). Stwierdzono, że próbka DB (kontrola) wykazywała bogaty profil białkowy, który we frakcji żołądkowej był niezwykle zredukowany, co wskazuje na intensywną degradację struktur białkowych. Za pojawienie się dodatkowych białek w profilu frakcji jelitowych odpowiadają białka enzymatyczne (lipazy, amylazy i proteazy) wprowadzone na tym etapie (Abdelouhab i in. 2015). Podobne obserwacje poczynili Hui i in. (2022), którzy analizowali zawartość białka metodą elektroforezy w mleku sojowym poddanym trawieniu *in vitro*. Już po 5 minutach trawienia w symulowanym żołądku liczba prążków i ich intensywność zmniejszyły się istotnie w porównaniu z frakcją trawioną w „jamie ustnej”. Jednak po 30 i 120 minutach trawienia w jelitach zaobserwowali nasilenie niektórych prążków o masie 25 i 35 kDa w porównaniu z frakcją żołądkową.

Postęp w trawieniu białek potwierdzono analizując profil wolnych aminokwasów dla frakcji po poszczególnych etapach trawienia *in vitro* za pomocą chromatografii cienkowarstwowej HPTLC. Próbki niepoddane trawieniu (kontrolne) wykazały bardzo podobny profil aminokwasowy, w którym zidentyfikowano glicynę ($R_f = 0,28$), walinę ($R_f = 0,45$) i leucynę ($R_f = 0,55$). W miarę postępu trawienia obserwowano nasilenie widocznych wcześniej prążków, głównie glicyny, waliny i leucyny oraz pojawienia się nowych w wyniku degradacji białek pod wpływem pepsyny i proteaz jelitowych. Badania techniką HPTLC mają jednak charakter jakościowy, ze względu na szybkość i koszty są przydatne do obrazowania różnic pomiędzy próbkami o tej samej matrycy.

Związki fenolowe i aktywność antyoksydacyjna

Analizę biodostępności związków przeciwutleniających z zaprojektowanych suplementów przeprowadzono metodą FRAP. Najwyższą biodostępność stwierdzono dla kapsułki DB, 42,05 i 52,68%, odpowiednio we frakcji żołądkowej i jelitowej (wykres 5d). Dla kapsułek z dodatkiem wapnia stwierdzono obniżenie biodostępności antyoksydantów o 22,36% (skorupki jaj) i 23,90% (węglan). Redukcja właściwości antyoksydacyjnych frakcji żołądkowej i jelitowej wydaje się wskazywać na blokowanie uwalniania związków antyoksydacyjnych z matrycy lub ich przemiany. Podobne wyniki uzyskali Seraglio i in. (2017), którzy badali dostępność związków antyoksydacyjnych w miodach odmianowych i wykazali spadek potencjału antyoksydacyjnego we frakcji jelitowej w porównaniu do frakcji nie trawionej (nawet o 33%).

Zawartość związków polifenolowych we frakcjach nietrawionych wynosiła 2,28; 2,56; 1,97 mg/kapsułkę (odpowiednio dla DB, DB+ES i DB+CC) (**publikacja V**, tab. 4). Biodostępność polifenoli z czystego czerwiu (DB) była największa, natomiast w obecności wapnia spadała (wykres 5d). Biodostępność polifenoli we frakcji jelitowej wynosiła 93, 52 i 62% odpowiednio dla suplementu BD, DB+EC i DB+CC, przy czym nie stwierdzono istotnych różnic w zależności od stosowanej formy wapnia. Podobną biodostępność związków polifenolowych wykazali de Paulo Farias i in. (2021) dla specyficznych owoców brazylijskich w zakresie 50-75% w porównaniu do frakcji niepoddanej trawieniu. Z kolei Mercatante i in. (2022) wykazali 50-89 % biodostępność omawianych związków z ekstraktów oliwnych, przy czym wyższe wartości stwierdzili we frakcjach żołądkowych. Nie bez znaczenia jest tutaj zróżnicowanie matrycy, a także warunków trawienia, które istotnie mogą wpłynąć na interakcje pomiędzy matrycą trawioną, a odczynnikami.

4.4.2. Bezpieczeństwo stosowania preparatów z czerwiu trutowego

Zaproponowany suplement diety łączący liofilizowany czerw trutowy z organicznym wapniem pozyskanym ze skorupki jaj kurzych wykazuje wysoką biodostępność (publikacja V), dzięki czemu mógłby znaleźć zastosowanie w profilaktyce/leczeniu osteoporozy. Jednak jego wdrożenie wymaga przeprowadzenia dalszych badań, które pozwolą ustalić przyswajalność (zdolność do

przenikania przez ścianę jelita) składników bioaktywnych. Zakładając, że składniki bioaktywne z naturalnego źródła będą dobrze przyswajalne, można dokonać wstępnej oceny bezpieczeństwa stosowania zaproponowanego preparatu.

To zagadnienie wydaje się być bardzo ważne, ze względu na zidentyfikowane w czerwiu trutowym hormony (testosteron i estradiol). Zbyt wysoki poziom testosteronu zwiększa ryzyko schorzeń układu sercowo-naczyniowego, może powodować obniżenie odporności, co w konsekwencji zwiększa podatność na inne schorzenia – od przewlekłych infekcji po choroby nowotworowe i depresję. Również niekontrolowane stosowanie estradiolu powoduje szereg zaburzeń, w tym wzdęcia lub skurcze brzucha, u kobiet krwawienia śródcykliczne, nudności, wymioty, senność, ból lub nadmierną wrażliwość piersi, rozdrażnienie oraz niepokój (Roop 2018; Ysraelit i Correale 2019; Domínguez-López i in. 2020).

Aby ustalić maksymalne bezpieczne dzienne spożycie czerwiu trutowego w postaci suplementu diety przeprowadzono kalkulacje zmierzające do porównania ilości hormonów dostarczanych dziennie z 3 kapsułkami suplementu z dawkami stosowanymi w celach terapeutycznych. W przypadku niedoboru, testosteron stosuje się doustnie lub zewnętrznie na skórę oraz w postaci domięśniowej, w postaci syntetycznych estrów o bioprzyswajalności nie przekraczającej 7% (Tauber i in. 1986). Zwykle stosowana doustna dawka dobowa przez pierwsze 2-3 tygodnie wynosi 120–160 mg, natomiast dawka podtrzymująca mieści się w zakresie 40–120 mg (<https://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/a/AndriolTestocaps.pdf>, dostęp dn. 4.04.2023 r.). Porównując, suplementacja trzema kapsułkami preparatu dziennie dostarczy organizmowi około 0,0225 µg/dobę tego hormonu, co stanowi zaledwie 0,00003-0,00006% dawki farmakologicznej stosowanej w leczeniu niedoborów. Obliczona wartość wskazuje na brak możliwości przedawkowania testosteronu przy stosowaniu zaprojektowanego preparatu. Podobnie wygląda sytuacja w przypadku estradiolu, w problemach hormonalnych związanych z niedoborem estradiolu (HTZ) zaleca się stosowanie preparatów zawierających od 0,5 do 2 mg tego hormonu dziennie (<https://www.womens-health-concern.org/>, dostęp dn. 4.04.2023 r.), a w celach antykoncepcyjnych 15-30 µg/dobę. Suplementacja preparatem na bazie czerwiu trutowego (3x1) dostarczy dziennie średnio 1,62 µg estradiolu (max 0,3% i 5,4% zalecanej dawki odpowiednio w hormonalnej terapii zastępczej

i antykoncepcyjnej). Z kolei realizacja dziennego zapotrzebowania na wapń przy suplementacji zaprojektowanym preparatem pokrywa 71-75% dziennego zapotrzebowania, co ważne w dawkach podzielonych (<https://healthybonesaustralia.org>, dostęp dn. 4.04.2023 r.).

Przedstawione kalkulacje pozwalają zakładać, że nawet przy 100% przyswajalności składników suplementu w jelicie stosowanie nowego suplementu wg zalecenia 3x1, wydaje się być całkowicie bezpieczne. Wymaga to jednak potwierdzenia w badaniach *in vivo*, ponieważ „hormony naturalne”, uważane za potencjalnie bezpieczniejsze, mogą wykazywać większą aktywność biologiczną niż ich syntetyczne odpowiedniki. Utrzymanie właściwego poziomu hormonów płciowych odgrywa kluczową rolę w rozwoju i utrzymaniu szkieletu kostnego zarówno u mężczyzn, jak i kobiet (Bandeira i in. 2010). Wraz z wiekiem zmniejszają się poziomy estradiolu i testosteronu, zwłaszcza wolnych lub biodostępnych frakcji, co prowadzi do utraty masy kostnej i złamań (Cauley 2015; Sakai i in. 2017). W tym aspekcie korzyści ze stosowania suplementacji czerwiem wydają się być niezwykle obiecujące, niewiele jednak wiadomo na temat wpływu czerwiu trutowego na gospodarkę hormonalną organizmu.

Badania z udziałem zwierząt nie były do tej pory prowadzone, a stosowanie czerwiu trutowego do efektywnej suplementacji organizmu w przypadku niedoborów hormonalnych jest oparte wyłącznie na doświadczeniu naturoterapeutów. W ostatnich latach podjęto pierwsze próby wykorzystania czerwiu trutowego w hodowli zwierząt. Najnowsze badania (Kosum i in. 2022) potwierdziły wpływ aplikacji czerwiu trutowego na korzystne efekty androgenne i wzrost koźląt. Jednak badania nad długotrwałym wpływem suplementacji paszy czerwiem (25 mg/kg paszy) na proces dojrzewania świń dały niespójne wyniki (Kistanova i in. 2020). Z jednej strony suplementacja czerwiem trutowym stymulowała wczesne stadia folikulogenezy u świń, z drugiej-c prowokowała atrezię w ostatniej fazie rozwoju pęcherzyków. Obiecujące wyniki przytoczonych eksperymentów z udziałem zwierząt wskazują na potrzebę kontynuacji badań nad aktywnością biologiczną czerwiu z udziałem różnych modeli biologicznych, a ostatecznie potwierdzenia w badaniach klinicznych.

4.5. Perspektywy rozwoju badań nad czerwiem trutowym

Według obowiązujących przepisów „Suplement diety jest środkiem spożywczym, którego celem jest uzupełnienie normalnej diety, będącym skoncentrowanym źródłem witamin lub składników mineralnych lub innych substancji wykazujących efekt odżywczy lub inny fizjologiczny, pojedynczych lub złożonych, wprowadzanym do obrotu w formie umożliwiającej dawkowanie”. Maksymalny dopuszczalny poziom składników bioaktywnych ma zapewnić bezpieczeństwo zdrowotne, pod warunkiem stosowania suplementu diety zgodnie z informacją zamieszczoną w opakowaniu. Dlatego przed wprowadzeniem na rynek, należy przeprowadzić szereg testów laboratoryjnych *in vitro* sprawdzających właściwości nowej substancji czynnej, a ostatecznie przeprowadzić próby doświadczalne z udziałem zwierząt. Te ostatnie eksperymenty najlepiej oddają efekty fizjologiczne, zarówno te korzystne jak i negatywne.

W tym aspekcie naturalną kontynuacją badań nad czerwiem trutowym jest zebranie dowodów potwierdzających korzystne działanie fizjologiczne i ustalenie optymalnego dawkowania. W ramach zrealizowanego projektu „Młodzi naukowcy UR” pt. „Możliwość zastosowania ekstraktów czerwiu trutowego w terapii nowotworów i niepłodności męskiej – badania wstępne *in vitro*” przeprowadzono wstępne badania aktywności czerwiu trutowego z wykorzystaniem 3 linii komórek nowotworowych, które pozwoliły ustalić efekt biologiczny czerwiu. Działanie cytotoksyczne ekstraktów z czerwiu trutowego (wodny i etanolowy) wobec linii komórkowych gruczolakoraka jelita grubego (Caco-2 i HT-29) oraz glejaka wielopostaciowego (U87MG) oceniono za pomocą testu żywotności komórek MTS. Wykazano większą aktywność ekstraktów wodnych w porównaniu z etanolowymi w stosunku do badanych komórek. Te wstępne wyniki są bardzo obiecujące i niezwykle cenne, ponieważ efekt przeciwnowotworowy czerwiu nie był do tej pory przedmiotem badań. Z uwagi na fakt, że zaprojektowane suplementy są dedykowane do profilaktyki i leczenia osteoporozy, lepszy model mogłyby stanowić komórki kostne - osteoblasty. Takie badania są planowane we współpracy z dr Alesem Pavlikiem z Uniwersytetu w Brnie (Czechy).

Innym zagadnieniem, które zrealizowano w ramach ww. projektu było badanie wpływu czerwiu trutowego na aktywność plemników *in vitro*. Badania przeprowadzone

w ramach współpracy z prof. Peterem Massanyi z Katedry Fizjologii Zwierząt Słowackiego Uniwersytetu Rolniczego potwierdziły ochronne działanie czerwiu trutowego dla modelowych plemników ogiera, przy czym lepsze rezultaty osiągnięto przy zastosowaniu czerwiu mrożonego niż liofilizowanego czy suchego ekstraktu. W literaturze brakuje informacji o wpływie czerwiu trutowego na męskie komórki rozrodcze, tymczasem jest on zalecany do leczenia zaburzeń płodności męskiej. Wykazanie ochronnego działania czerwiu trutowego na plemniki pozwala na rekomendowanie tego produktu do przedłużania żywotności plemników w nasieniu przechowywanym przeznaczonym do sztucznej inseminacji, co może zwiększyć szanse na zapłodnienie. Korzystne działanie na plemniki *in vitro*, pozwala przewidywać potencjalne korzyści spożywania czerwiu trutowego dla jakości nasienia *in vivo*.

W świetle ostatnich regulacji dopuszczających do spożycia kolejne owady (świerszcze domowe) nie można pominąć możliwości wprowadzenia czerwiu trutowego jako „novel food” („nowa żywność”), czyli żywności, która nie była wykorzystywana w znacznym stopniu w Unii Europejskiej przed 15 maja 1997 r. Takim mianem określa się produkty wyprodukowane z użyciem nowych technologii, ale również takie, które są tradycyjnie spożywane poza UE. Wymaga to jednak rejestracji i wpisania do unijnego wykazu „Novel Food Catalogue”. Czerw trutowy, jako składnik żywności pochodzący od zwierząt, nie ma jeszcze ustalonego bezpieczeństwa stosowania, co może być przeszkodą do wprowadzenia tego produktu na rynek. Podobna sytuacja dotyczyła rejestracji jadu pszczelego jako naturalnego konserwantu do żywności, podjęta decyzja odmowna dotyczy konieczności przeprowadzenia szacowania ryzyka bezpiecznego spożycia.

Z punktu widzenia żywieniowego owady stanowią istotną, aczkolwiek niedocenianą alternatywę dla składników odżywczych dostarczanych z konwencjonalnych źródeł zwierzęcych. Wraz ze stale zwiększającą się liczbą ludności na świecie zapotrzebowanie na składniki odżywcze, w tym np. pełnowartościowe białko wzrasta, co przyczynia się do poszukiwań alternatywnych źródeł białka (Piasecka – Kwiatkowska i Stasińska 2016; Bueschke i in. 2017). Należy jednak pamiętać, że mogą one zawierać składniki bioaktywne, które należy limitować, stąd istnieje ogromna potrzeba prowadzenia badań zmierzających do ustalenia bezpieczeństwa spożycia.

5. Podsumowanie i wnioski

Czerw trutowy to mniej znany produkt pszczele, stosowany w niektórych krajach Europy Wschodniej i Azji w celach leczniczych, jednak o słabo udokumentowanych w literaturze naukowej właściwościach prozdrowotnych. Większość doniesień dotyczących tego produktu pszczelego pochodzi z Rumunii i Rosji, zostały opublikowane w latach 2000-2010, jednak ich dostępność jest ograniczona. Rosnące zainteresowanie naturalnymi środkami leczniczymi, w tym produktami apiterapeutycznymi, zintensyfikowały badania krajowe, które dla czerwiu prowadzone są zaledwie od kilku lat. Zrealizowane w ramach pracy doktorskiej badania pozwoliły uzupełnić luki w literaturze światowej nt. właściwości i pozyskiwania bioaktywnego czerwiu trutowego od rodzin pszczoły miodnej *A. mellifera carnica* w zakresie: zmienności składu chemicznego czerwiu w kolejnych stadiach rozwojowych, możliwości odróżniania czerwiu od mleczka pszczelego oraz efektywnych sposobów utrwalania. Istotnym osiągnięciem pracy jest charakterystyka materiału krajowego, co umożliwia porównania dla czerwiu pozyskiwanego w innych częściach świata. Z kolei, wykazanie wysokiej biodostępności składników czynnych czerwiu daje podstawy do rozważania możliwości jego stosowania jako wartościowego suplementu diety.

Z przeprowadzonych badań wynikają następujące wnioski:

1. Czerw trutowy niezależnie od fazy rozwoju (dzień 7, 11 i 14) stanowi cenne źródło wielu składników tj. białko i aminokwasy, testosteron i estradiol, związki polifenolowe, głównie hydrofilowe kwasy fenolowe i flawonoidy, jednak ich poziom ulega zmianie w trakcie rozwoju larwalnego.
2. Czerw na wcześniejszych etapach rozwoju (między 7 a 11 dniem) wykazuje większą aktywność antyoksydacyjną i zawartość estradiolu, z kolei poziom testosteronu i białka rośnie wraz z postępowaniem rozwoju, co pozwala wskazać 11 dzień jako optymalny wiek do pozyskiwania czerwiu o największej wypadkowej bioaktywności.
3. Faza rozwoju jest kluczowym czynnikiem decydującym o aktywności biologicznej czerwiu, warunki pasieczne i pochodzenie geograficzne w mniejszym stopniu wpływają na zmienność materiału biologicznego.

4. Aktywność hormonalna, enzymatyczna i antyoksydacyjna czerwiu trutowego jest istotnie większa w porównaniu z mleczkiem pszczelim, a proste oznaczenia aktywności markerowych kwaśnych glikozydaz (HEX, i α -GLU) pozwalają jednoznacznie rozróżnić te materiały, wykluczając możliwość zafałszowania mlecza czerwem.
5. Czerw pobrany z ula musi być natychmiast utrwalony ze względu na zachodzące procesy utleniania (ciemnienie), które można zahamować na drodze szybkiego mrożenia, a następnie liofilizacji, nie powodującej istotnych zmian aktywności przeciwutleniającej i pozwalającej uzyskać stały produkt o zwiększonej stabilności, nadający się do długotrwałego przechowywania w temperaturze pokojowej w hermetycznym opakowaniu.
6. Zastosowanie wstępnej obróbki polegającej na usunięciu nierozpuszczalnych struktur komórkowych na drodze ekstrakcji wodnej, i liofilizacji otrzymanego ekstraktu pozwala otrzymać suchy ekstrakt czerwiu o zwiększonej rozpuszczalności i całkowitej zawartości polifenoli.
7. Utrwalenie czerwiu mrożonego lub liofilizowanego w miodzie (max. dodatek 4%) pozwoliło na pełne zachowanie jego właściwości antyoksydacyjnych podczas 6-miesięcznego przechowywania w temperaturze pokojowej, dalsze przechowywanie powodowało jednak spadek potencjału antyoksydacyjnego, ponadto ze względu na zawartość wody zwiększenie udziału czerwiu mrożonego nie jest wskazane (możliwość fermentacji), takie ograniczenie nie występuje dla liofilizatu czerwiu.
8. Składniki bioaktywne czerwiu trutowego wykazują wysoką biodostępność w warunkach symulowanego trawienia *in vitro*, przy czym hormony uwalniają się głównie we frakcji jelitowej, białko niemal całkowicie jest trawione w żołądku, a związki polifenolowe są obecne na obydwu etapach trawienia na podobnym poziomie.
9. Biodostępność badanych składników czerwiu z zaprojektowanych dwuskładnikowych suplementów diety w formie kapsułek, zawierających liofilizowany czerw trutowy i wapń nie uległa zmniejszeniu, co więcej większą

biodostępność testosteronu i strawność białka uzyskano w przypadku połączenia czerwiu z organicznym wapniem (mielone skorupki jaj).

10. Technika HPTLC zastosowana po raz pierwszy w badaniach czerwiu, ze względu na szybkość i niskie koszty oraz możliwość jednoczesnego porównania kilkunastu próbek, może być polecana do obrazowania jakościowych i ilościowych różnic w profilu polifenolowym, cukrowym i aminokwasowym frakcji uzyskanych z poszczególnych etapów symulowanego trawienia *in vitro*.
11. Zaprojektowany innowacyjny suplement łączący zalety czerwiu trutowego i wapnia naturalnego pochodzenia, o potwierdzonej synergistycznej biodostępności składników, posiada wysoki potencjał stosowania w profilaktyce osteoporozy, jednak jego wdrożenie wymaga oceny przyswajalności, wywoływanych efektów biologicznych i toksykologicznych w badaniach *in vivo*.

Zrealizowane badania potwierdziły bogactwo składników odżywczych i bioaktywnych występujących w krajowym czerwiu trutowym pozyskanym w odpowiedniej fazie rozwoju. Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie czerwiu trutowego do suplementacji diety, zarówno w postaci opracowanych suplementów jak i miodu z dodatkiem czerwiu może przynieść wiele korzyści zdrowotnych, jednak wymagana jest kontynuacja badań mających na celu potwierdzenie jego skuteczności i brak skutków ubocznych dla ludzi.

6. Literatura

1. Abdelouahab N., Nabila B., Roza S., Slimane B., Dako E., Pascal A., Mouloud B.M. 2015. Molecular weight determination of a protease extracted from *Mucor pusillus*: comparison methods. *Food and Nutrition Sciences*, 6: 348–354.
2. Arts M.J., Haenen G.R., Voss H.P., Bast A. 2004. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 9.
3. Bakchiche B., Habati M., Benmebarek A., Gherib A. 2017. Total phenolic, flavonoid contents and antioxidant activities of honey and propolis collected from the region of Laghout (South of Algeria). *World News of Natural Sciences*, 11: 91–97.
4. Baltaci A.K., Mogulkoc R., Baltaci S.B. 2019. The role of zinc in the endocrine system. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32 (1): 231–239.
5. Bałkańska R., Karadjova I., Ignatova M. 2014. Comparative analyses of chemical composition of royal jelly and drone brood. *Bulgarian Chemical Communications*, 46: 412–416.
6. Bałkańska R., Marghitas L.-A., Pavel C.I. 2017. Antioxidant Activity and Total Polyphenol Content of Royal Jelly from Bulgaria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6: 578–585.
7. Bandeira F., Lazaretti-Castro M., Bilezikian J.P. 2010. Hormones and bone. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 54: 85–86, doi:10.1590/S0004-27302010000200001.
8. Barnutiu L.I., Marghitas L.A., Dezmirean D., Bobis O., Mihai C., Pavel C. 2013. Physico-chemical composition of apilarnil (bee drone larvae). *Lucrări Științifice, Seria Zootehnie*, 59: 199–202.
9. Barrett A., Heath M. Lysosomal enzymes. In *Lysosomes: A Laboratory Handbook*; Dingle, J., Ed.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press: Amsterdam, The Netherlands, 1977; s. 19–30.
10. Bartter J., Diffey H., Yeung Y.H., O'Leary F., Häsler B., Maulaga W., Alders R. 2018. Use of chicken eggshell to improve dietary calcium intake in rural sub-Saharan Africa. *Maternal and Child Nutrition*, 14 (S3): e12649.
11. Bielajew W.A., Safonowskaja J.W. 2009. Adaptogenic relationship training based on drone brood. *Beekeeping*, 6: 51–52.
12. Bogdanov, S. Royal Jelly and Bee Brood: Harvest, Composition, Quality. In *The Royal Jelly Book*; Bee Product Science: Muethlethurnen, Switzerland, 2012; Available online: www.bee-hexagon.net
13. Bolatovna K.S., Rustenov A., Eleuqalieva N., Omirzak T., Akhanov U.K. 2015. Improving reproductive qualities of pigs using drone brood homogenate. *Biology and Medicine*, ., 7.
14. Budnikowa N.W. 2009. Biologically active compounds in drones. *Beekeeping*, 6: 52–53.
15. Bueschke M., Gramza-Michałowska A., Kubiak T., Kulczyński B. 2017. Alternatywne źródła białka w żywieniu człowieka. *Zeszyty Naukowe SGGW w Warszawie – Problemy Rolnictwa Światowego*, 17: 49–59.
16. Burmistrowa L. Physico-Chemical and Biological Appreciation of Drone Brood. Ph.D. Thesis, Ryazan Medical University, Ryazan, Russia, 1999.
17. Cauley J.A. 2015. Estrogen and bone health in men and women. *Steroids*, 99: 11–15.
18. Ciużyńska A., Lenart A. 2011. Freeze-drying - application in food processing and biotechnology - a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61: 165–171.
19. Collazo N., Carpena M., Nuñez-Estevéz B., Otero P., Simal-Gandara J., Prieto M.A. 2021. Health Promoting Properties of Bee Royal Jelly: Food of the Queens. *Nutrients*, 13, 543.
20. Cornara L., Biagi M., Xiao J., Burlando B. 2017. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Front Pharmaceutical*, 8: 1–20.

21. Czekońska K., Chuda-Mickiewicz B., Samborski J. 2015. Quality of honeybee drones reared in colonies with limited and unlimited access to pollen. *Apidologie*, 46: 1–9
22. Czekońska K., Tofilski A. 2010. Body mass of honey bee drones developing in constant and in changing temperatures. *Apidologie*, 51: 510–518.
23. Czerkasowa A.I., Prochoda I.O. 2006. A new addition of drone larvae - an alternative to royal jelly. *Narodowy Uniwersytet Farmaceutyczny (Ukraina)*, 65-69.
24. de Paulo Farias D., de Araújo F.F., Neri-Numa I.A., Dias-Audibert F.L., Delafiori J., Catharino R.R., Pastore G.M. 2021. Effect of *in vitro* digestion on the bioaccessibility and bioactivity of phenolic compounds in fractions of *Eugenia pyriformis* fruit. *Food Research International*, 150, doi:10.1016/j.foodres.2021.110767.
25. Domínguez-López I., Yago-Aragón M., Salas-Huetos A., Tresserra-Rimbau A., Hurtado-Barroso S. 2020. Effects of dietary phytoestrogens on hormones throughout a human lifespan: A review. *Nutrients*, 12: 1–25.
26. Droba B., Droba M., Sibirnaja L. Enzymy hydrolityczne z grupy kwaśnych glikozydaz występujące w mleczku pszczelim. Właściwości Produktów i Surowców Żywnościowych, Wybrane Zagadnienia; PTTZ : Kraków, Poland, 2014; s. 125–135.
27. Droba B., Droba, M., Sibirnaja, L. 2016. Aktywność kwaśnych glikozydaz w mleczku pszczelim pozyskiwanym z mateczników na różnych etapach rozwoju larwy. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 584: 13–21.
28. Džugan M., Lis M. 2016. Cadmium-induced changes in hatchability and in the activity of aminotransferases and selected lysosomal hydrolases in blood plasma of Muscovy ducklings (*Cairina Moschata*). *Acta Veterinaria Hungarica*, 64 (2): 239-249.
29. Džugan M., Lis M., Droba M., Niedziółka, J.W. 2011. Effect of cadmium injected *in ovo* on hatching results and the activity of plasma hydrolytic enzymes in newly hatched chicks. *Acta Veterinaria Hungarica*, 59: 337–347.
30. Džugan M., Tomczyk M., Sowa P., Grabek-Lejko D. 2018. Antioxidant activity as biomarker of honey variety. *Molecules*, 23: 2069, doi:10.3390/molecules23082069.
31. Finke M.D. 2005. Nutrient composition of bee brood and its potential as human food. *Ecology of Food and Nutrition*, 44: 257-270.
32. Ghosh S., Sohn H.Y., Pyo S.J., Jensen A.B., Meyer-Rochow V.B., Jung C. 2020. Nutritional composition of *Apis mellifera* Drones from Korea and Denmark as a potential sustainable alternative food source: Comparison between developmental stages. *Foods*, 9: 389.
33. Grabek-Lejko D., Miłek M., Sidor E., Puchalski C., Džugan M. 2022. Antiviral and Antibacterial Effect of Honey Enriched with *Rubus* spp. as a Functional Food with Enhanced Antioxidant Properties. *Molecules*, 27: 4859.
34. Hockling B., Matsumura F. 1960. Bee brood as food. *Bee World*, 41 (5): 113-120
35. Hui T., Tang T., Gu X., Yuan Z., Xing G. 2022. Comparison on Protein Bioaccessibility of Soymilk Gels Induced by Glucono- δ -Lactone and Lactic Acid Bacteria. *Molecules*, 27: 6202.
36. Iliesiu N. 1988. A modern preparation of bees "Apilarnil". *Informator Regionalny Zrzeszenia Pszczelarzy Apipol*, 10: 15–20.
37. Isidorov V.A., Bakier S., Stocki M. 2016. GC-MS investigation of the chemical composition of honeybee drone and queen larva homogenate. *Journal of Apicultural Sciences*, 60: 111–120.
38. Isidorow W.A. Alchemia pszczół. Sądecki Bartnik, Stróże 2013, s. 64-69.
39. Islam M.K., Sostanic T., Lim L.Y., Hammer K., Locher C. 2020. Sugar profiling of honeys for authentication and detection of adulterants using high- performance thin layer chromatography. *Molecules*, 25: 5289.
40. Jensen A.B., Evans J., Jonas-Levi A., Benjamin O., Martinez I., Dahle B., Roos N., Lecocq A., Foley K. 2019. Standard methods for *Apis mellifera* brood as human food. *Journal of Apicultural Research*, 58: 1–28.

41. Kabała-Dzik A., Smagacz O., Marquard W. 2007. Shielding effect of bee brood in relation to embryotoxic compounds-acetylsalicylic acid. *Proceedings from Sciences Beekeeping Conference*, 44: 138–139.
42. Kędzia B., Hołderna- Kędzia E. Mniej znane produkty pszczele. Sądecki Bartnik, Stróże 2017.
43. Kistanova E., Zdoroeva E., Nevitov M., Nosov A., Vysokikh M., Sukhanova I., Vishnyakova P., Abadijeva D., Ankova D., Rashev P., Boryaev G. 2020. Drone brood fed supplement impacts on the folliculogenesis in growing gilts. *Veterinarski Arhiv*, 90 (6): 583–592.
44. Kobus-Cisowska J., Szymanowska-Powałowska D., Szymandera-Buszka K., Rezler R., Jarzębski M., Szczepaniak O., Marciniak G., Jędrusek-Golińska A., Kobus-Moryson M. 2020. Effect of fortification with calcium from eggshells on bioavailability, quality, and rheological characteristics of traditional Polish bread spread. *Journal of Dairy Science*, 103: 6918–6929.
45. Kocot J., Kiełczykowska M., Luchowska-Kocot D., Kurzepa J., Musik I. 2018. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018: 7074209.
46. Kolayli S., Sahin H., Can Z., Yildiz O., Malkoc M., Asadov A. 2016. A member of complementary medicinal food: Anatolian royal jellies, their chemical compositions, and antioxidant properties. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 21: 43–48.
47. Komisar O.D. 2006. Homogenate of drone licks as a sum of erroneous statements and unresolved issues. *Narodowy Uniwersytet Farmaceutyczny (Ukraina)*, 6: 87-92.
48. Korany M.A., Moneeb M.S., Asaad A.M., El-Sebakhy N., El-Bana A.A. 2020. A validated stability- indicating HPTLC assay for determination of 10-hydroxy-2-decenoic acid content in royal jelly products using robust regression methods. *Journal of Chromatographic Science*, 58: 520–534.
49. Kosum N., Yucel B., Kandemir C., Taskin T., Duru M.E., Kucukayadin S., Margaoan R., Cornea-Cipcigan M. 2022. Chemical Composition and Androgenic Effect of Bee Drone Larvae (Apilarnil) for Goat Male Kids. *Chemistry & Biodiversity*, 19: e202200548.
50. Kotynia Z. , Szewczyk P., T.-G.G. 2017. Bezpieczeństwo stosowania suplementów diety – dopuszczanie do obrotu w Polsce. *Kontrola Państwowa*, 62: 49–51.
51. Krell, R. Value—Added from Beekeeping; Bulletin No. 124; FAO Agricultural Services: Rzym, Włochy 1996, s. 409–411
52. Kryłow, W.N.; Agafonow, A.W.; Kriwcow, N.I. Theory and Methods of Apitherapy; GNU: Moscow, Russia, 2007; pp. 168–180. (In Russian)
53. Kusumi N., Nakamura M., Tando Y., Suda T., Kudo K. 1999. Egg - shell calcium solubility in stomach. *Japanese Journal of Nutrition Assessment*, 16: 291–296.
54. Latimer, G.W. Official Methods of Analysis of AOAC International; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA 2016.
55. Liang N., Kitts D.D. 2014. Antioxidant property of coffee components: assesment of methods that define mechanisms of action. *Molecules*, 19: 19180-19208.
56. Mandla R., Kumar N.R. 2016. Comparison of carbohydrates in the worker, drone and queen brood food of *Apis mellifera* during spring. *Journal of Global Biosciences*, 5: 3765–3768.
57. Margaoan R., Marghitas L.A., Dezmiorean D.S., Bobis O., Bonta V., Catana C., Urcan A., Muresan C.I., Margin M.G. 2017. Comparative Study on Quality Parameters of Royal Jelly, Apilarnil and Queen Bee Larvae Triturate. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies*, 74: 51–58.
58. Martinello M., Mutinelli F. 2021. Antioxidant activity in bee products: A review. *Antioxidants*, 10, 71.

59. Mercatante D., Ansorena D., Taticchi A., Astiasarán I., Servili M., Rodriguez-Estrada M.T. 2022. Effects of *In Vitro* Digestion on the Antioxidant Activity of Three Phenolic Extracts from Olive Mill Wastewaters. *Antioxidants*, 12.
60. Miłek M., Ciszkowicz E., Sidor E., Hęclik J., Lecka-Szlachta K., Dżugan M. 2023. The Antioxidant, Antibacterial and Anti-Biofilm Properties of Rapeseed Creamed Honey Enriched with Selected Plant Superfoods. *Antibiotics*, 12, 235.
61. Mosaic M., Trifkovic J., Vovk I., Gasic V., Tesic Z., Sikoparija B., Milojkovic-Opsenica D. 2019. Phenolic composition influences the health promoting potential of bee- pollen. *Bioelements*, 9, 783.
62. Nabas Z., Haddadin M.S., Haddadin J., Nazer I.K. 2014. Chemical composition of royal jelly and effects of symbiotic with two different locally isolated probiotic strains on antioxidant activities. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 64: 171–180.
63. Omelka R., Martiniakova M., Svik K., Slovak L., Payer J., Oppenbergerova I., Kovacova V., Babikova M., Soltosova-Prnova M. 2021. The effects of eggshell calcium (Biomin H®) and its combinations with alfacalcidol (1 α -hydroxyvitamin D3) and menaquinone-7 (vitamin K2) on ovariectomy-induced bone loss in a rat model of osteoporosis. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, , 105 (2): 336–344.
64. Piasecka-Kwiatkowska D., Stasińska, B. Białka niekonwencjonalne i białka modyfikowane. W: J. Gawęcki, (red.), Białka w żywności i żywieniu. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2016, s. 67-70.
65. PN-88/A-77626. Miód pszczeleli. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.
66. Prokhoda A., Yankina O., Kim N., Koltun G., Skolov A. 2020. Chemical composition of the far eastern homogenate of drone brood. E3S Web Conference, 203, 4015.
67. Prokhoda L.A. 2009. Apilarye products for functional nutrition. *Pczelowodstwo*, 7: 51-52
68. Ramadan M.F., Al-Ghamdi A. 2012. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of Functional Foods* , 4: 39–52. doi:10.1016/j.jff.2011.12.007.
69. Ray S., Kumar Barman A., Kumar Roy P., Kumar Singh B. 2017. Chicken eggshell powder as dietary calcium source in chocolate cakes. *The Pharma Innovation Journal*, 6 (9): 1–4.
70. Rodriguez-Rodriguez E., Navia Lomban B., Lopez-Sobaler A.M., Ortega Anta R.M. 2010. Review and future perspectives on recommended calcium intake. *Nutricion Hospitalaria*, 25 (3): 366–374.
71. Roop J.K. 2018. Hormone Imbalance—a cause for concern in women. *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 4: 237–251.
72. Rumpold B.A., Schlüter O.K. 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57: 802-823.
73. Sabatini A.M., Caboni G., Bogdanov M.S., Almeida-Muradian L. 2009. Quality and standardisation of Royal Jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1: 16–21.
74. Sakai S., Hien V.T.T., Tuyen L.D., Duc H.A., Masuda Y., Yamamoto S. 2017. Effects of eggshell calcium supplementation on bone mass in postmenopausal Vietnamese women. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 63 (2): 120–124.
75. Sawczuk R., Karpinska J., Milyk W. 2019. What do we need to know about drone brood homogenate and what is known. *Journal of Ethnopharmacology*, 245, doi:10.1016/j.jep.2018.10.042.
76. Sawczuk R., Karpińska J., Filipowska D., Bajguz A., Hryniewicka M. 2022. Evaluation of total phenols content, anti-DPPH activity and the content of selected antioxidants in the honeybee drone brood homogenate. *Food Chemistry*, 368, 130745.
77. Sewerynek E. 2011. Current indications for prevention and therapy of steroid-induced osteoporosis in men and women. *Endokrynologia Polska*, 62: 38–44.
78. Shofian N.M., Hamid A.A., Osman A., Saari N., Anwar F., Dek M.S.P., Hairuddin M.R. 2011. Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 4678–4692.

79. Shoinbayeva K.B., Omirzak T., Bigara T., Abubakirova A., Dauylbay A. 2017. Biologically active preparation and reproductive function of stud rams. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 11: 184–191.
80. Sidor E., Miłek M., Tomczyk M., Dżugan M. 2021a. Antioxidant activity of frozen and freeze-dried drone brood homogenate regarding the stage of larval development. *Antioxidants*, 10 (5), 639.
81. Sidor E., Strzałka A., Dżugan M. Analiza aktywności antyoksydacyjnej miodów z dodatkiem mandarynek i goździków. W: *Żywność dzisiaj. Lokalna czy globalna, tradycyjna czy innowacyjna? Monografia pokonferencyjna*, red. Monika Beszterda-Buszczak, Monika Przeor. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2022.
82. Silici S. 2019. Chemical Content and Bioactive Properties of Drone Larvae (*Apilarnil*). *Mellifera*, 19: 14–22.
83. Sołodenko J. 2015. How to properly use honey and other beekeeping products. Drone larvae homogenate- drone milk. *Apiterapia*, 14-15.
84. Stable formulations of testosterone undecanoate, China, CN106456782B, 2015.
85. Stanek N., Jasicka-Misiak, I. 2018. HPTLC Phenolic Profiles as Useful Tools for the Authentication of Honey. *Food Analytical Methods*, , 11: 2979-2989.
86. Stangaciu S. Hartenstein E. Medicines from the bee pharmacy. Wyd. KDC, Rosja 2007, s. 62-64.
87. Tomczyk M., Miłek M., Sidor E., Kapusta I., Litwińczuk W., Puchalski C., Dżugan M. 2020. The Effect of Adding the Leaves and Fruits of *Morus alba* to Rape Honey on Its Antioxidant Properties, Polyphenolic Profile, and Amylase Activity. *Molecules*, 25, 84.
88. Ulmer M., Smetana S., Heinz V. 2020. Utilizing honeybee drone brood as a protein source for food products: Life cycle assessment of apiculture in Germany. *Resources, Conservation and Recycling*, 154, 104576
89. Vasilenko Y.K., Klishina I.I., Lazaryan D.S. 2005. A comparative study of the immunotropic and hepatotropic action of beekeeping products in rats with drug- induced hepatitis. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 39: 319–322.
90. Vitali D., Dragojević I.V., Šebečić B. 2009. Effects of incorporation of integral raw materials and dietary fibre on the selected nutritional and functional properties of biscuits. *Food Chemistry*, 114 (4): 1462–1469.
91. Wang Y., Ma L., Zhang W., Cui X., Wang H., Xu B. 2016. Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 47: 48–56.
92. Wilde J., Bąk B. 2002. Bee brood - an unconventional source of animal protein. *Biuletyn Naukowy*, 18: 229-237
93. Wyszynska M., Kabała-Dzik A., Szaflarska-Stojko E. 2008. Observations on the hepatoprotective effect of DNA extract from bee brood. *Farmaceutyczny Przegląd Naukowy*, 4: 21–23.
94. Wytrychowski, M., Chenavas S., Daniele G., Casabianca H., Batteau M., Guibert S., Brion B. 2013. Physicochemical characterization of French royal jelly: Comparison with commercial royal jellies and royal jellies produced through artificial bee-feeding. *Journal of Food Composition*, 29: 126–133.
95. Ysraelit M.C., Correale J. 2019. Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development. *Immunology*, 156: 9–22, doi:10.1111/imm.13004.
96. Yucel B., Acikgoz Z., Bayraktar H., Seremet C. 2011. The effects of Apilarnil (drone bee larvae) administration on growth performance and secondary sex characteristics of male broilers. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10: 2263–2266.
97. Täuber U., Schröder, K. Düsterberg B. Absolute bioavailability of testosterone after oral administration of testosterone-undecanoate and testosterone. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 1986, 11, 145–149.

Aneks: Pozostałe osiągnięcia naukowe

Publikacje:

1. Monika Tomczyk, Michał Miłek, Ewelina Sidor, Ireneusz Kapusta, Wojciech Litwińczuk, Czesław Puchalski, Małgorzata Dżugan. *The Effect of Adding the Leaves and Fruits of Morus alba to Rape Honey on Its Antioxidant Properties, Polyphenolic Profile, and Amylase Activity*. *Molecules* 2020, 25, 84, <https://doi.org/10.3390/molecules25010084>.
2. Patrycja Sowa, Dana Marcinčáková, Michał Miłek, Ewelina Sidor, Jaroslav Legáth, Małgorzata Dżugan. *Analysis of Cytotoxicity of Selected Asteraceae Plant Extracts in Real Time, Their Antioxidant Properties and Polyphenolic Profile*. *Molecules* 2020, 25 (23), 5517. <https://doi.org/3390/molecules25235517>.
3. Ewelina Sidor, Małgorzata Dżugan. Hasło w Encyklopedii: *Drone brood*. W: *Molecules Encyclopedia* 2020. [org/10.3390/molecules25235699](https://doi.org/10.3390/molecules25235699).
4. Michał Miłek, Dorota Grabek-Lejko, Ewelina Sidor, Mateusz Mołoń, Małgorzata Dżugan. *The enrichment of honey with Aronia melanocarpa fruits enhances its in vitro and in vivo antioxidant potential and intensifies antibacterial and antiviral properties*. *Food & Function* 2021. <https://doi.org/10.1039/D1FO02248B>.
5. Małgorzata Dżugan, Michał Miłek, Ewelina Sidor, Monika Tomczyk. *Miód pszczelej w żywieniu i profilaktyce zdrowotnej*. *Przemysł Spożywczy* 2021, 75, 03, <https://doi.org/10.15199/65.2021.3.4>.
6. Ewelina Sidor, Monika Tomczyk, Małgorzata Dżugan. Application of Ultrasonic or Microwave Radiation to Delay Crystallization and Liquefy Solid Honey *Journal of Apicultural Science* 2021, 65 (2): 243-253, doi: 10.2478/jas-2021-0027
7. Małgorzata Dżugan, Dorota Grabek-Lejko, Ewelina Sidor, Monika Tomczyk. *The impact of ultrasound decrystallization on enzymatic, antioxidant and antibacterial properties of honey*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2021, 71, 102709. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102709>.
8. Ewelina Sidor. *Prozdrowotne właściwości czerwiu trutowego*. *Pasieka* 4/2021, 48-50.
9. Dorota Grabek-Lejko, Michał Miłek, Ewelina Sidor, Czesław Puchalski, Małgorzata Dżugan. Antiviral and Antibacterial Effect of Honey Enriched with Rubus spp. as a Functional Food with Enhanced Antioxidant Properties. *Molecules* 2022, 27(15):4859; doi:10.3390/molecules27154859.
10. Małgorzata Dżugan, Michał Miłek, Patrycja Kielar, Karolina Stępień, Ewelina Sidor Aleksandra Bocian. SDS-PAGE Protein and HPTLC Polyphenols Profiling as a Promising Tool for Authentication of Goldenrod Honey. *Foods* 2022, 11(16):2390; doi:10.3390/foods11162390.
11. Michał Miłek, Ewa Ciszkowicz, Ewelina Sidor, Joanna Hęćlik, Katarzyna Lecka-Szlachta, Małgorzata Dżugan. The antioxidant and antibacterial properties of rapeseed honey enriched with selected plant superfoods. *Antibiotics* 2023, 12 (2), DOI: 10.3390/antibiotics12020235.
12. Monika Tomczyk, Anna Czerniecka-Kubicka, Michał Miłek, Ewelina Sidor, Małgorzata Dżugan. Tracking of Thermal, Physicochemical, and Biological Parameters of a Long-Term Stored Honey Artificially Adulterated with Sugar Syrups. *Molecules* 2023, 28, 1736. doi: 10.3390/molecules28041736

Monografie

1. Małgorzata Dżugan, Michał Miłek, Ewelina Sidor, Dorota Grabek-Lejko. *Synergistyczne działanie miodu i roślin leczniczych*. Oficyna Wydawnicza „Zimowit”. Rzeszów 2020. ISBN 978-83-7996-822-0.

Rozdziały w monografiach

1. Ewelina Sidor, Alicja Strzałka, Małgorzata Dżugan. *Analiza aktywności antyoksydacyjnej miodów z dodatkiem mandarynek i goździków*. W: *Żywność dzisiaj. Lokalna czy globalna, tradycyjna czy innowacyjna? Monografia pokonferencyjna*, red. Monika Beszterda-Buszczak, Monika Przeor. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2022.
2. Ewelina Sidor, Małgorzata Dżugan. *Możliwości wykorzystania czerwiu trutowego jako suplementu diety*. W: *Potencjał biologiczny żywności część 2*, red. Grażyna Gajdek, Czesław Puchalski. Wydawnictwo Uniwersytetu Rzeszowskiego, Rzeszów 2021.
3. Ewelina Sidor, Paulina Bernat, Małgorzata Dżugan. *Ocena aktywności przeciwutleniającej naparów herbacianych słodzonych miodem*. W: *Przyszłość w żywności – żywność w przyszłości*, red. Anna M. Salejda i Anna Kancelista. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Wrocław 2020.
4. Ewelina Sidor, Monika Tomczyk, Michał Miłek, Małgorzata Dżugan. *Wpływ dodatku suszonych liści, liofilizowanych owoców lub soku z owoców morwy białej *Morus alba* L. na wybrane parametry jakościowe miodu rzepakowego*. W: *Jakość i bezpieczeństwo żywności*, red. Grażyna Gajdek, Czesław Puchalski. Wydawnictwo Uniwersytetu Rzeszowskiego, Rzeszów 2020.
5. Ewelina Sidor, Martyna Czachor, Piotr Kuźniar, Małgorzata Dżugan. *Wartość odżywcza, parametry tekstury i ocena organoleptyczna batonów wytworzonych na bazie orzechów włoskich i miodu*. W: *Żywność a oczekiwania współczesnego konsumenta (pod red. Stanisław Kowalski, Gabriela Zięć, Iwona Drożdż)*, 129-142, ISBN 978-83-66602-10-6, Kraków, 2020.
6. Adrian Frydrych, Ewelina Sidor, Wiktoria Litwa, Małgorzata Dżugan. *Jakościowa analiza palinologiczna i aktywność antyoksydacyjna barwnych frakcji pyłku pszczelego*. W: *Jakość i bezpieczeństwo żywności*, red. Grażyna Gajdek, Czesław Puchalski. Wydawnictwo Uniwersytetu Rzeszowskiego, Rzeszów 2020.

Sumaryczny współczynnik IF = 54,260;

Suma punktów MEiN = 1585

(dane: <http://bibliografia.ur.edu.pl/>, współczynnik IF i punktacja podane na rok opublikowania pracy)

h-index: 6 (wg bazy danych Scopus z dn. 3.04.2023 r.)

Wygłoszone referaty konferencyjne

1. *Właściwości antyoksydacyjne miodu rzepakowego z dodatkiem suszonych liści lub soku z owoców morwy białej (*Morus alba* L.)*, Jakość Życia w Bio- Tech- i Ekosystemach, Rzeszów 2019, Polska, (**prelegent**)
2. *Dekrytalizacja miodu*, "Innovativa" Young Scientists International Conference VIII-th Edition, Oradea 2019, Rumunia, (**prelegent**)
3. *Evaluation of the antioxidant activity of milk using various analytical protocols*, "Innovativa" Young Scientists International Conference IX-th Edition, Oradea 2019, Rumunia, (**prelegent**)
4. *Mikroplastiki i rPET- dwa oblicza plastiku*, IV Konferencja Naukowa „Retardacja przekształcania zasobów środowiska. Osiągnięcia, problemy, perspektywy”, Rzeszów 2020, Polska, (współautor, posteru)

5. *The changes of glycosidases activities in varietal honeys during liquefying*, XVI Międzynarodowa Konferencja Naukowa Studentów i Podyplomowych: „Młodzież i postęp w biologii”, Lwów 2020, Ukraina, **(prelegent)**
6. *Searching for the fast method for detection of honey adulteration*, XVI Międzynarodowa Konferencja Naukowa Studentów i Podyplomowych: „Młodzież i postęp w biologii”, Lwów 2020, Ukraina (współautor)
7. *Możliwości wykorzystania czerwiu trutowego jako suplementu diety*, Jakość Życia w Bio-Tech- i Ekosystemach, Rzeszów 2020, Polska, **(prelegent)**
8. *Antioxidant activity of honey enriched with Aronia melanocarpa*, AgroFood, Uniwersytet Rzeszowski, Rzeszów 2020, Polska, (współautor)
9. *Influence of grinding method and extraction solvent on antioxidant activity of drone brood*, Ștefan cel Mare University of Suceava 9th Edition of Student in Bucovina, Suceava 2020, Rumunia, **(prelegent)**
10. *Fermentation of different carbohydrates using water kefir grains*, Ștefan cel Mare University of Suceava 9th edition of Student in Bucovina, Suceava 2020, Rumunia, (współautor)
11. *Antioxidant and enzymatic activity of drone brood homogenates*, “Innovativa” Young Scientists International Conference X-th Edition, Oradea 2020, Rumunia, **(prelegent)**
12. *Aktywność antyoksydacyjna czerwiu trutowego*, Ogólnopolska 58. Konferencja Pszczelarska, Puławy 2021, Polska, **(prelegent)**
13. *Zimowy osyp pszczół jako źródło substancji bioaktywnych*, Ogólnopolska 58. Konferencja Pszczelarska, Puławy 2021, Polska, (współautor)
14. *Metody zapobiegania krystalizacji miodu w przetwórstwie spożywczym*, Ogólnopolska 58. Konferencja Pszczelarska, Puławy 2021, Polska, (współautor)
15. *The production of water kefir based on honey and its sensory evaluation*, XIX. International Scientific conference of Bachelor’s and Master’s degree students of the Faculty of Biotechnology and Food Sciences SUA in Nitra, Nitra 2021, Słowacja, (współautor)
16. *Ocena aktywności przeciwutleniającej naparów herbacianych słodzonych miodem*, XXV Sesja naukowa Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Wrocław 2021, Polska, **(prelegent)**
17. *Pierzga jako wartościowy suplement diety dla osób starszych*, Międzynarodowa Konferencja Naukowa Polskiego Towarzystwa Nauk Żywnościowych, pt. „Żywność a Jakość Życia Osób Starszych/Nutrition and Quality of Life of the Elderly, Warszawa 2021, Polska, **(prelegent)**
18. *Właściwości prozdrowotne miodów z dodatkiem innych produktów pszczelich*, Międzynarodowa Konferencja Naukowa Polskiego Towarzystwa Nauk Żywnościowych, pt. „Żywność a Jakość Życia Osób Starszych/Nutrition and Quality of Life of the Elderly, Warszawa 2021, Polska, **(prelegent)**
19. *Właściwości prozdrowotne miodów z dodatkiem superowoców*, XLV Sesja Naukowa Komitetu Nauk o Żywności i Żywieniu PAN, Gdańsk 2021, Polska, **(prelegent)**
20. *Drone brood as a dietary supplement – benefits and limitations*, XXI International Conference Risk Factors in Food Chain, Iwonicz 2021, Polska, **(prelegent e-poster)**
21. *Czerw trutowy jako naturalny suplement diety*, II Ogólnopolska Konferencja Studentów i Doktorantów „Żywność. Żywność. Rynek. Innowacje w nauce i praktyce”, Warszawa 2021, Polska, **(prelegent)**
22. *Aktywność wybranych kwaśnych glikozydaz w czerwiu trutowym i mleczku pszczelim*, CZŁOWIEK-ŻYWNOSĆ-ŚRODOWISKO, Rzeszów 2021, Polska, **(prelegent)**
23. *Honey enriched with drone brood as a new product with a high biological activity*, HUMAN-NUTRITION-ENVIRONMENTAL, Rzeszów 2021, Polska, (poster)
24. *Aktywność antyoksydacyjna mrożonego i liofilizowanego czerwiu trutowego utrwalonego miodem*, Ogólnopolska 59. Konferencja Pszczelarska, Puławy 2022, Polska, **(prelegent)**
25. *Możliwości wykorzystania propolisu jako naturalnego konserwantu żywności*, Ogólnopolska 59. Konferencja Pszczelarska, Puławy 2022, Polska, (współautor)

26. *Fermentacja pyłku w warunkach laboratoryjnych - Czy możemy naśladować pszczoły?*, Ogólnopolska 59. Konferencja Pszczelarska, Puławy 2022, Polska, (współautor)
27. *Czerw trutowy jako nowy suplement diety - bezpieczeństwo i ryzyko stosowania*, VI Symposium "Bezpieczeństwo Żywnościowe i Żywności", Kiry k. Zakopanego 2022, Polska, **(prelegent)**
28. *Analiza aktywności antyoksydacyjnej miodów z dodatkiem liofilizowanych mandarynek i goździków*, XXVI Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej, Poznań 2022, Polska, **(prelegent)**
29. *First attempt to study biological effect of drone brood using in ovo model*, XXII Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Risk Factors of Food Chain”, Węgierska Górka 2022, Polska, **(prelegent)**
30. *Czerw trutowy w profilaktyce osteoporozy*, Zielony Parasol, VI Konferencja Pszczelarzy, Ekologów i Leśników, Regionalne Centrum Sportowo-Widowiskowe PODPROMIE, Rzeszów 2022, Polska, **(prelegent)**
31. *Badanie bioprzyswajalności czerwiu trutowego in vitro*, 60. Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy 2023, Polska, **(prelegent, e-poster)**
32. *Analiza porównawcza naturalnej pierzgi pszczelej i spontanicznie fermentowanego pyłku pszczelego*, 60. Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy 2023, Polska, (współautor)
33. *Sposób wytwarzania propolisowo-ziołowego biokonserwantu do żywności*, 60. Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy 2023, Polska, (współautor)
34. *Biodostępność in vitro nowego suplementu diety na bazie czerwiu trutowego*, XXVII Sesja Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ "Rozwój Nauk o Żywności. Zrównoważona przyszłość", Warszawa 2023, Polska, **(prelegent)**
35. *Spirulina (Arthrospira platensis) as a component of functional drinks*, Xth International Session of Young Scientific Staff "Food Science Development. Sustainable Future", Warszawa 2023, Polska, **(prelegent, e-poster)**

łącznie: 35 doniesień konferencyjnych, z czego:

25 jako prelegent (w tym **3** prezentacje w formie e-posteru)

10 jako współautor prezentacji/posteru

Załącznik nr 1 do uchwały nr 118/07/2022
Rady Naukowej Kolegium Nauk
Przyrodniczych dnia 12 lipca 2022 r.

Rzeszów, dnia 6.04.2023 r.

Imię i nazwisko mgr inż. Ewelina Sidor

Jednostka Instytut Technologii Żywności i Żywienia, Zakład Chemii i Toksykologii
Żywności

Promotor prof. dr hab. inż. Małgorzata Dżugan

Promotor pomocniczy dr inż. Monika Tomczyk

OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowywaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, oświadczam niniejszym, że wkład mojej pracy naukowej (w ramach dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia), a tym samym pracy pozostałych współautorów w opublikowaniu poniższych artykułów, które zamierzam przedstawić jako własną dysertację doktorską jest następujący:

I. Ewelina Sidor, Małgorzata Dżugan. *Drone Brood Homogenate as Natural Remedy for Treating Health Care Problem: A Scientific and Practical Approach*. *Molecules* 2020, 25 (23), 5699.

- koncepcja badań – współtworzenie zarysu pracy, zagadnień, które zostaną w niej poruszone, przeszukiwanie baz danych i zbiorów literatury
- przygotowanie pierwszej wersji pracy
- korekta pracy zgodnie z zaleceniami promotora
- pełnienie obowiązków autora korespondencyjnego – wysłanie pracy w systemie, kontakt z przydzielonym Edytorem czasopisma

..... Ewelina Sidor

Podpis

Oświadczenia współautorów

1. **prof. dr hab. inż. Małgorzata Dżugan**
Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Ewelinę Sidor udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- koncepcja badań – współtworzenie zarysu pracy, zagadnień, które zostaną w niej poruszone, przeszukiwanie baz danych
- sprawdzanie i sugestie w trakcie pisania i zatwierdzenie ostatecznej wersji manuskryptu
- zapoznanie doktorantki z systemem wprowadzania manuskryptu do systemu redakcyjnego wydawnictwa MDPI



.....
Podpis

Review

Drone Brood Homogenate as Natural Remedy for Treating Health Care Problem: A Scientific and Practical Approach

Ewelina Sidor * and Małgorzata Dżugan 

Department of Chemistry and Food Toxicology, Institute of Food Technology and Nutrition, University of Rzeszow, Ćwiklińskiej 1a Street, 35-601 Rzeszow, Poland; mdzugan@ur.edu.pl

* Correspondence: ewelina.sidor@poczta.onet.pl

Academic Editors: Nada Orsolich and Maja Jazvinščak Jembrek

Received: 19 November 2020; Accepted: 1 December 2020; Published: 3 December 2020



Abstract: Drone brood homogenate is a little-known bee product used in folk medicine to treat various health problems. It is a very nutritious milky substance with high content of nutrients: proteins, lipids, fatty acids, carbohydrates, vitamins (A, B, E and D), and minerals. Moreover, when collected on early stage of larvae development, it is, most of all, rich source of sex hormone (testosterone, progesterone and estradiol). Some beekeepers consider drone brood as a waste product, although in some countries they use it to fight *Varroa*. Meanwhile, in many scientific reports a curative effect of bee drone homogenate in treating urgent global health problems have been confirmed, including ovarian dysfunction in women and male infertility, thyroid and immunity disorders, as well as malnutrition in children. A few dietary supplements based on drone brood are available online. Many patents relating to drone brood-based dietary supplements have been filed in Russia, but their prevalence in EU countries is still limited. Further research is needed to fully recognize the pharmacological activity and increase the use of drone brood.

Keywords: drone brood; apilarnil; steroid hormones; therapeutic value; dietary supplement

1. Introduction

Honey and other bee products, i.e., pollen, bee bread, propolis, royal jelly, and wax have been valued as food stuffs all over the world since ancient times [1,2]. The basis for the comprehensive use of bee products in human nutrition and treatment is their diverse and unique chemical composition, including the content of numerous characteristic substances with a bioactive effect [3]. Bee products are naturally occurring pharmaceutical products with a multidirectional effect on the living organism, including humans. Their pharmacologically active fractions are used in many fields of treatment and pharmacy as pharmacopoeial raw materials, dietary supplements and cosmetics [4–6]. The biologically active compounds of bee products include bactericidal agents and antioxidants [7]. Drone brood is one of the bee products that are not commonly known in Europe but is a recognized and frequently used remedy in some countries of the world, such as Romania, China, Zambia, Senegal and Ecuador [8–12].

Drones, as male honeybees, are one of polymorphic forms of bees, next to the queen and worker bees. Drones bite their way out of the drone cell on the 24th day after egg laying [12] and are easily recognisable by their large size, oval body, large eyes and strong wings. They do not have pollen sacs, a wax gland or sting. They appear in bee colony in spring and their only task is to inseminate with a queen during her mating flight. The few drones that do get a chance to mate die after mating.

Drones typically compose 5–10% of the adult population of bee colony during the breeding season from spring to autumn with a peak in the late spring or early summer. A colony might adjust

drone production in relation to season (length of day and temperature) and other environmental cues, including size of colony, availability of food as well as colony microclimate [13].

Drone brood homogenate (known as apilarnil or less apistimul) is a bee product obtained by the collection of drone larvae from drone cells, from 3 to 11 days after hatching [14,15]. Apilarnil, which may be defined as the male equivalent of royal jelly, is obtained from drone brood and then freeze-dried. It was discovered by the Romanian apitherapist Nicolae V. Iliesiu. Etymologically, the term originates from “api” for bee, “lar” for larvae, and “nil” as a shortened form of its discoverer’s name, Nicholae Iliesiu [16].

Currently, many studies characterizing the morphological composition, properties and use of drone brood are available [12,16–19]. The literature lacks a description of the detailed characteristics of the raw material variability which depend on the development stage. In addition, drone brood quickly loses biological activity once it is removed from a wax comb, so fixation strongly determines its effectiveness [20]. Considering the above, the aim of the study was to review the scientific reports regarding the chemical composition variability as well as pharmaceutical potential of the drone brood homogenate. Moreover, the e-market and worldwide patent base was searched in terms of practical application of drone brood as dietary supplements.

2. Drone Brood Origin

Drone brood is defined as male bees developing in wax comb cells from unfertilized eggs by a process known as parthenogenesis. The development of drones (24 days) is longer than that of queens and workers (16 and 21 days, respectively) [21]. Over the first ten days, the drones develop in an open cell and the larvae are progressively provisioned by workers. The final 14 days of development occur under capping. Workers bees close the cells with queen bees and workers with a cap, while the drone cells are closed with a convex cap. This difference in caps allows for the identification of male brood in the comb. During their time of enclosure within the cell, pre-pupa and pupa do not feed, metamorphosis occurs (Figure 1), and the process of spermatogenesis is completed [22].

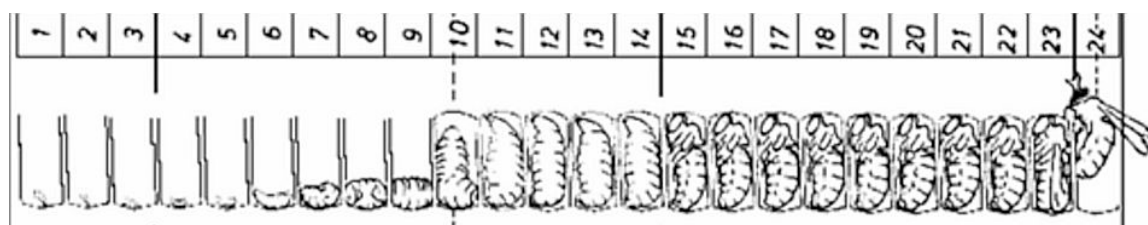


Figure 1. Drone brood development stage [23].

In the first days of development (day 1–3), regardless of the polymorphic form, the larva weighs about 0.11 mg [21]. It is only from the 4th day that the body weight and length of the various larvae begin to differ, depending on their polymorphic form. A seven-day-old queen larva weighs 270 mg, a worker larva 80 mg, and a drone larva 120 mg [22,24]. On the day of sealing (day 11) the drone larvae reach a weight of 350 mg; thus, their weight is greater than that of the mother and bee larva [24]. Moreover, they contain more proteins, lipids and sulfhydryl groups. Considering the above and the ease of collecting from comb wells, 11-day-old drone brood is most suitable for technological use [19].

In the field of beekeeping, drone brood is sometimes treated as waste whereas it should be used for the sake of wealth of valuable nutrients and bioactive ingredients. However, the amount of drone brood present in the colony regulates drone production through a negative feedback process [12]; thus, the removal of drones from the colony should upregulate drone production when they are harvested regularly. Current evidence indicates that the practice of drone brood removal is an effective method of controlling *Varroa* spp. [14]. In Europe, particularly in Nordic countries, this technique combined with chemical treatment, is used as part of a *Varroa* spp. trapping strategy [12].

3. Stability and Preservation of Drone Brood

Drone brood used for technological processing should be obtained on the appropriate development day. Literature data concerning the best day of collecting material from the comb are strongly divergent [25]. According to Stangaciu and Hartenstein [24] and Solodenko [26], these should be 6–7 days old larvae. In turn, Czerkasowa and Prochoda [27] have indicated that 7–9 days is optimal, while Budnikowa [14] has indicated that 10–14 days old pupae are best suited for technological processing. This discrepancy is a consequence of taking into account drone brood activity by some authors whereas other focused on the usefulness of material for processing.

Obtaining larvae from the combs may be easier prior to capping as the larvae can then be removed from the combs with a stream of water. For capped brood combs, freezing the comb (at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ or in liquid nitrogen $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) is recommended before proceeding with manual separation. A fast and less labor-intensive method is squeezing the unfrozen or thawed brood combs above a sieve and letting the juices pass through the sieve. However, such juice needs to be frozen or used immediately because it oxidizes extremely quickly [12].

Cutting out the drone larvae from the hive is associated with a loss of biological properties in a very short time. It is important to process the acquired brood within 24 h or to protect it against the loss of beneficial properties. Moreover, drone brood is very sensitive to bacterial activity, so it should be stored in freezer [12,28]. The larvae can be stored for up to 6 days at a temperature of $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$, and for up to 10 months at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ without losing their biological properties [29]. It is possible to freeze larvae or homogenate in liquid nitrogen ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). However, this is a very costly process and is not suitable for small-scale use [29], where usually the honey is used to preserve drone brood. For this purpose, a previously prepared homogenate of drone brood is added to honey in amounts up to 1–2% of the final volume. Storage at room temperature of the final product allows for the maintenance of its properties for 6 months. Kryłow et al. [30] proved that the preservation of the homogenate with honey at a concentration of 3–5%, and storage at $6\text{--}12\text{ }^{\circ}\text{C}$ allows for the maintenance of properties for 6 months. An effective method of preserving drone brood is to mix the larvae with 40% ethyl alcohol in a 1:1 ratio [20]. It is also possible to dry the drone larvae. They can be dried with natural sun rays or with the use of air-circulating dryers ($70\text{--}75\text{ }^{\circ}\text{C}$). Infrared or heating lamps are also used for drying. This thermal process protects drone brood for 7 months. Deposition on the adsorbent is another method of brood conservation. The combination of glucose and lactose in the ratio of 1:1, and then brood and adsorbent (1:6), allows the product to be stored for 3 years at room temperature, after prior placement of the product in a refrigerator ($4\text{--}6\text{ }^{\circ}\text{C}$) for 3 months [31].

4. Functional Components of Drone Brood

The chemical composition of fresh drone brood is similar to that of royal jelly. Drone brood homogenate is characterized by a higher water content but its protein and carbohydrate content is lower than that in royal jelly [32,33]. A comparison of the physicochemical and chemical properties of fresh drone homogenate, lyophilizate (apilarnil) and fresh royal jelly is presented in Table 1.

Table 1. Physical properties and chemical composition of raw drone brood homogenate in comparison with the apilarnil product [17,34–38] as well as royal jelly [35,38–40].

Characteristic	Quality Parameters		
	Raw Homogenate, Preserved Homogenate	Lyophilizate (Apilarnil)	Fresh Royal Jelly
Sensory properties	dense, cream-like liquid of yellow colour with characteristic odour	amorphous powder of beige to yellow colour with characteristic odour	creamy texture, odourless, but with a distinctive, bitter and tart taste
Solubility	sparingly soluble in water and ethanol practically insoluble in ether		dissolves well in ethyl alcohol, acetone and ether
Chemical Composition [%]			
Proteins	7.2–10	9–12	14.6–18.3
Carbohydrates	6.9–8.0	6–17	8.5–10.8
Lipids	3.1–5	5–8	3–8
Ash	3.00	3.00	0.8–3.0
Water content	78.5	3.5	61.0–65.2
Dry matter	25–29	25–35	32.6
pH	5.5–7.5	4.5–6.5	3.8–4.0
Acidity [M/l]	0.7–1.10	-	3.7–4.4
Conductivity [μ S/cm]	144.0–178.0	-	194.0–219.0

Drone brood homogenate is a milky, dense substance with creamy consistency. Its colour varies from white and yellowish to pale grey [28,36]. It is characterized by a sweet, with a slightly sour taste and distinctive smell similar to that of royal jelly [36,38]. The greatest differences in the physicochemical composition were observed between fresh and freeze-dried brood homogenate in terms of water content.

4.1. Proteins and Amino Acids

Fresh drone brood is a rich source of protein compared to other bee products. Lazaryan et al. [35] reports that it constitutes 38.5% of the product, while Bogdanov [41] has determined that it makes up 52.3% of fresh drone brood. In addition, drone brood is a source of 20 amino acids, including 8.7% in the free state, and 15.9% of exogenous amino acids. The essential amino acids, include threonine, valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine, histidine and tryptophan. Among all of the amino acids found in drone brood, the greatest amounts are glutamic acid (6.5% of all amino acids), leucine and aspartic acid (3.6% each), proline (3.4%), lysine (2.9%), valine (2.3%) and alanine (2.1%) which make up about 60% of all amino acids. Taurine and phosphoserine are non-protein amino acids found in drone brood [42]. Similar proportions of the amino acid composition are found in royal jelly. Substance with the highest content (similarly to drone brood) is glutamic acid (8.3%), tyrosine (4.3%), proline (3.9%), aspartic acid (2.8%), leucine (3.0%), lysine (2.9%) and valine (1.6%). A relatively large part of the protein amino acids consists of methionine (3.7%), tryptophan (3.4%) and arginine (3.3%), which are present in drone brood in trace amounts [28].

4.2. Lipids

Drone brood is a source of lipids and according to Iliesiu [43] and Stangaciu and Hartenstein [24] they account for 5–8% of the total composition. Slightly different values are given by Barnuti et al. [28] and Narumi et al. [44]. Similarly, Isidorov et al. [18] showed the lipid content in drone brood at the level of 3.5%. This group of substances includes triglycerides, free fatty acids, fatty acid esters and decenoic acids. The fatty acids include saturated acids (40%), of which palmitic and stearic acids are the most abundant and 50% of the contents were monounsaturated acids where oleic acid constitutes 32.3% of this group. Drone brood is also a source of polyunsaturated fatty acids (10%), of which linoleic

and γ -linolenic are present in the highest amounts (1.1 and 1.7% respectively). Polyunsaturated acids as essential unsaturated fatty acids must be supplied to the body in a healthy diet [21].

Most of the fatty acids contained in the drone brood exist in the form of esters [30]. This bee product is a relatively large source of glyceryl-1,2-dioleate-3-palmitate ester. Additionally, plant sterols which form a specific group of lipid compounds were found in the brood. Those which occur in the highest amounts are campesterol (5.5 mg/100 g), β -sitosterol (1.3 mg/100 g), stigmasterol (0.2 mg/100 g) and 5-hydroxysitosterol (1.3 mg/100 g) [38]. They belong to a group of phytosterols (plant substances) which have a similar structure to human cholesterol. A regular intake of these components in a diet (about 2 g daily) helps to lower cholesterol effectively, reducing the risk of atherosclerosis and heart attack and protecting against some cancers, as well as prostate hyperplasia [44].

4.3. Sugars

The comprehensive characterization of sugars present in the brood was carried out by Barnutiu et al. [28]. On the basis of the results obtained, the highest percentage of glucose and fructose was found (68.3% and 11.4% respectively). In the composition of the drone brood other sugars, occurring in smaller amounts, were identified (Figure 2). Similar results were reported by Stangaciu and Hartenstein [24].

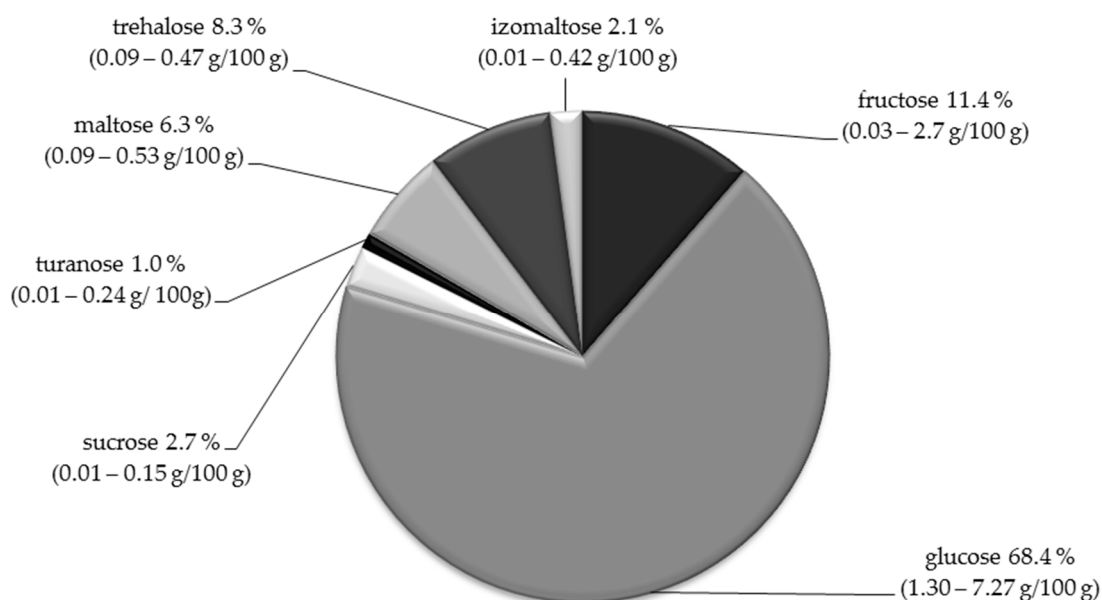


Figure 2. The sugar profile of drone brood homogenate as % share [27]. The range of sugar content in [g/100 g] of the drone brood homogenate is presented in brackets [27].

4.4. Hormones

Drone brood contains two types of hormones: those regulating the development of the larvae and the sex ones. Juvenile and moulting (metamorphosis) hormones influence the development of drone larvae. The juvenile hormone stimulates the growth of drone larvae and inhibits metamorphosis, while the moulting hormone (ecdysone) inhibits the growth of larvae and stimulates shedding and the transformation of larvae into pupae [45]. Moreover, drone brood is a source of both male (testosterone) and female sex hormones (estradiol, progesterone, prolactin) [14,34,46,47].

Those present in the highest amounts are estradiol and prolactin, while the hormone at the lowest level is testosterone (Figure 3). The content of this male steroid hormone in seven-day-old drone brood is approx. 0.03 nmol/mL. It is four times higher than in the fresh royal jelly. The level of sex hormones in the developing drone larvae varies according to the stage of development [34,41,43], the older larva the higher testosterone and lower progesterone and estradiol levels.

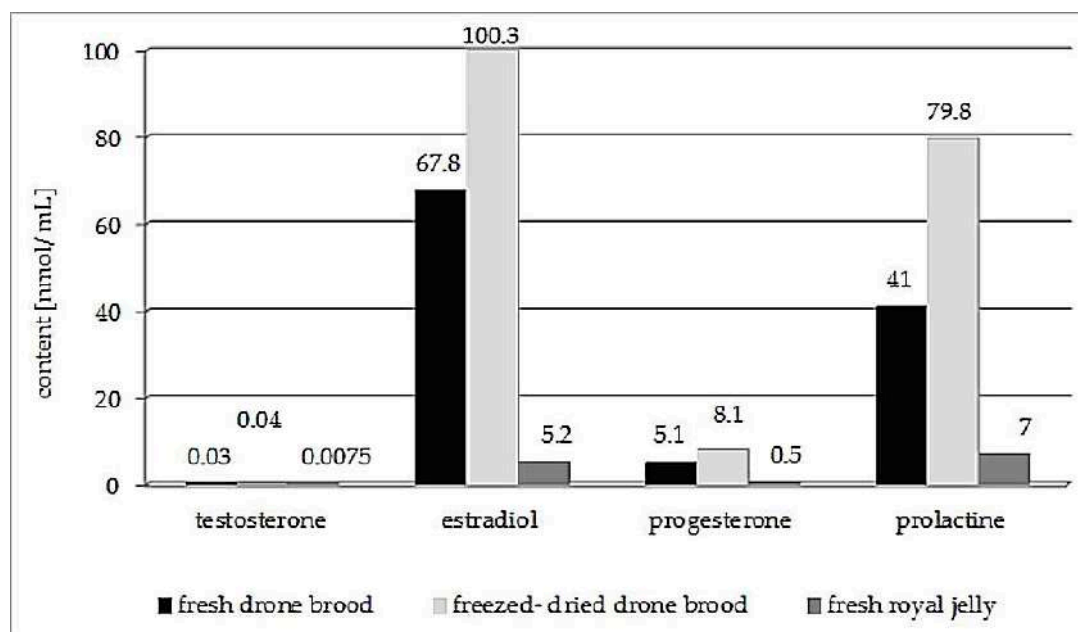


Figure 3. Hormone levels (nmol/mL) in seven-day-old drone brood compared to royal jelly [14,34,47].

4.5. Vitamins and Bioelements

Drone brood is a rich source of both groups of vitamins: water and fat soluble (Table 2). The high content of choline and α -tocopherol is especially noteworthy [27]. In drone brood, relatively large amounts of pantothenic acid and calciferol occur [27,36].

Table 2. Vitamins and bioelements present in powder drone brood [4,15,34,38,44].

Vitamin	Content in Drone Brood [mg/100 g]	Bio Elements	Content in Drone Brood [mg/100 g]
Thiamine (vit. B1)	2.3–4.1	Sodium (Na)	41–900
Riboflavin (vit. B2)	0.1–3.8	Potassium (K)	140–656
Nicotinic acid (vit. B3)	0.3–15.8	Calcium (Ca)	47–126
Choline (vit. B4)	44.3–68.1	Magnesium (Mg)	20–424
Pantothenic acid (vit. B5)	2.6–13.4	Phosphorus (P)	189–330
Pyridoxine (vit. B6)	0.2–0.5	Iron (Fe)	2.4–3.2
Retinol (vit. A)	0.01–0.05	Manganese (Mn)	0.1–4.4
β -carotene (provit. A)	0.03–0.9	Zinc (Zn)	1.3–6.5
α -tocopherol (vit. E)	0.4–1.6	Copper (Cu)	0.6–2.4
Calciferol (vit. D)	0.4–0.6	Selenium (Se)	0.01–0.02

Drone brood is relatively rich in sodium, potassium, calcium, magnesium and phosphorus [47]. The presence of iron, magnesium, zinc, copper, chromium, iodine and selenium was also found. Moreover, according to Sołodenko [26], nickel, gold and silver are present in drone brood.

4.6. Antioxidant Activity

Bee products have strong antibacterial and antioxidant properties. The antioxidant components include: polyphenolic compounds, vitamins C and E, enzymes, and other elements [7]. The antioxidant activity of various bee products has been frequently measured using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazole (DPPH) radical test correlated with total phenolics content (by Folin-Ciocalteu method) (Table 3). Among compared bee products, the highest antioxidant activity was found for propolis, next bee pollen and drone brood homogenate. Moreover, the homogenate of drone brood contains the highest amount of polyphenolic compounds among the tested bee products (Table 3).

Table 3. Total phenolic compounds and antioxidant activity (DPPH) of the bee products [19,48–50].

Bee Products	TPC [mg GAE/ kg]	DPPH [%]
Rape honey	254.2	21.8
Multifloral honey	490	39.9
Coniferous honeydew	585.9	66.8
Propolis	1610	96.1
Bee pollen	2340	89
Royal jelly	171	76
Drone brood homogenate	8340	81.6

5. Drone Brood in Scientific Reports

The rich chemical composition of the drone brood contributes to the high degree of biological activity and leads to a beneficial effect on the human body. Due to high protein, vitamins and hormone levels, drone brood effectively prevents the processes of cellular aging and many diseases. This healing effect is widely described by scientists from Romania, Slovakia, Ukraine and Russia [27,31,42]. The *in vivo* studies carried out to date with the use both animals and humans, indicate the positive effect of drone brood in the treatment of hypothyroidism, liver diseases, it is also used in adaptogenic therapies and in the treatment of infertility (Table 4). In addition, drone brood has antioxidant properties, protects the fetus and increases immunity.

Table 4. Scientific research focused on the use of drone brood in the treatment of various health problems.

Therapeutic Action	Effects	Biological Model	References
Fertility problems and libido reinforcing agent	Alleviates the effects of disorders associated with the menopause in women, increases the body's immune resistance, increases mental immunity, alleviates symptoms such as: increased heart rate and breathing, feeling hot, excessive sweating	Humans	[30,43]
	Improvement in reproductive properties, increase in the weight in the seminal gland by nearly 22%, increase in the rate of recovery of sexual function, improvement in sperm quality, i.e., ejaculation volume, survival and mobility	Boars, rams	[47,51]
Decrease in cholesterol and triglycerides levels	Lowering the level of cholesterol and triglycerides after two months of use	Rats	[52]
Hepatoprotective activities and stimulates the immune system	Lowering the level of alanine transaminase, alkaline phosphatase and bilirubin in the blood serum	Rats	[53]
	DNA obtained from drone brood protects liver tissue against the hepatotoxic effects of acetylsalicylic acid, buserelin and carbon tetrachloride	Rats	[54]
Fetal shielding properties	Protect the fetus against the harmful effects of acetylsalicylic acid	Rats	[55]
Healing effect in nervous and mental diseases	Improves the mental state of patients with depressive neurosis, fatigue, anorexia, feelings of helplessness	Humans	[43]
	Positive effect on the symptoms of neurasthenia (fatigue, weariness, dizziness)	Humans	[56]
	Improvement in memory, reduction of psychomotor lability, return of sphincter control	Humans	[43]
	Improvement of neurovegetative and sexual functions in elderly people	Humans	[32]

Table 4. Cont.

Therapeutic Action	Effects	Biological Model	References
Antiatherosclerotic effect	The administration of lyophilized brood administered to rats for two months decreased the content of cholesterol by nearly 50%, triglycerides by 25% and β -lipoproteins by over 30% in the blood serum compared to the control group.	Rats	[52]
Thyroid disorders	The concentration of thyroxine and triiodothyronine increased by 40%, while the thyroid stimulating hormone decreased by 37% after 30 days of brood administration	Dogs	[57]
Antioxidant effect	Lowers the content of unoxidized substances in blood serum of animals fed drone brood by about 25% compared to control animals	Rats	[58]
Malnutrition in children	Consumption of several doses resulted in weight gain, improvement in general health and appetite, as well as tissue tension.	Humans	[43]
Anaemia	Administration of freeze-dried drone brood to mutant mice with hereditary haemolytic anemia increased their survival rate. The mouse survival was increased from 2 weeks to 7 months in 50% of the animals	Mutant mice	[59]
Other disease	Means of treating urinary tract diseases, diabetes, diarrhea, relieving chest pain, migraines, constipation and to prevent stretch marks on the skin of pregnant women.	Humans	[24,60,61]

5.1. Effects on the Reproductive System and Fertility

The studies aimed at testing the influence of drone brood on the treatment of male infertility was initiated by Iliesiu [43]. As a result of the research, an increase in sexual performance was found, and the functioning of the testicles improved. Consuming the brood has also led to the elimination in some cases of erectile dysfunction. All of the observations were confirmed by tests determining the number of sperm. In another clinical trial [62], infertile men ($n = 68$) with infertility resulting from the symptoms of sexual neurosis, which is responsible for problems with ejaculation and orgasm. The research carried out by Krylow [30] has shown that drone brood has an androgenic effect and also stimulates the production of testosterone which alleviates sexual disorders.

The androgenic activities of drone brood have been intensively studied in vivo with the use of animals. Seres et al. [63] used an experimental model using rats to test the effectiveness of drone brood on the androgenic functions in males. Increased plasma testosterone levels have been observed in animals receiving drone brood, the same tendency in the weight of the penis glans and seminal vesicle was found. In the control groups (both false control and flutamide application group), no significant changes were observed. Similarly, Bolatovna et al. [47] illustrates that the administration of drone brood solution by injection in pigs increases the weight of the seminal gland and the survivability and mobility of boar sperm. This research also corroborates the idea of the usage of drone brood as a therapy for testosterone deficiency. Experiments with the use of broiler chicks showed the effectiveness of the use of drone brood in the development of secondary sexual characteristics and the length of the comb [64]. It was shown that broilers that received brood with their feed had a longer comb than the control broilers. A similar relationship was observed by Allen et al. [65] who additionally found that broilers which were fed brood showed higher blood testosterone levels.

A few studies reported the usefulness of drone brood in alleviating the symptoms of menopause in woman [43]. It has been shown that drone brood has a supportive effect in neurovegetative disorders in women, with impaired physical and mental fitness, as well as those with a tendency towards depression [30]. Moreover, the use of drone brood by women reduced the initial symptoms of menopause, such as feeling hot, and an increased breathing and heart rate, headaches and dizziness,

as well as excessive sweating [66]. The authors emphasize that women using drone brood tolerated it very well.

5.2. Adaptogenic Effect of Drone Brood

Drone brood is characterized by an ability to increase the body's non-specific immunity [53]. Moreover, it improves the physical and mental resistance of experimental animals [30]. It was found that feeding rats with drone brood improved their physical resistance during a swimming test. The experiment also consisted of testing the changes in the level of cortisol in the blood serum of the animals. It was proved that its content in rats subjected to physical activity was 20% higher than at the beginning of the experiment. The results obtained show a clear protective effect against the stress associated with the swimming test. In addition, the obtained results indicate an increase in the mental resistance of the tested animals caused by the drone brood treatment.

Drone brood homogenate was administered in rabbits for two weeks by oral ingestion intraoral intake of 0.6 mL/kg every 48 h (controls treated with gelatin). The experiments showed a decrease of oxidated reaction products in blood and increase of the cell resistance of the drone brood treated rabbits. The thiobarbituric reactive substances (a measure of lipid peroxidation and oxidative stress) decreased by 26%, while that of the controls increased by 25%. At the same time, serum sialic acid concentration (an indicator of glycosylation disorders) decreased in the treated groups by 20% while the controls it increased by 24%. The research conducted proves the influence of drone brood in increasing the immunity of the nervous system to the harmful influence of external factors [58]

6. Drone Brood as Dietary Supplement

In many countries (Japan, China, Romania, Russia, Ukraine) brood drones are obtained for preparing snacks in the fried or baked form. They are added to dishes, e.g., instead of toasts for soups or in the form of sauces. Drone brood was used to prepare tinctures, preserves or sweets. Moreover, it is used in the production of dietary supplements and medications [12,67]. However, only a few commercial products were found for sale in Europe online, including Romanian *Apilarnil Potent*, Canadian *ApiDhron*[®], Slovenian *Femoklim*[®] or Turkish *Harşena Apiterapi Ürünleri*. Meanwhile, many handmade products are offered by apiaries, also as combination with propolis and pollen or honey. All known preparations based on the drone brood, due to extreme chemical instability of its active ingredients, as a rule, contain stabilizing additives, for example, honey, sucrose, lactose or glucose. According to Burmistrova [68], the storability of fresh bee brood can be improved, by binding fresh drone brood to a glucose/lactose adsorbent with the additive of L-ascorbic acid as an antioxidant (50 mg/kg). If the mixture is dried until 4% humidity, product is stable at 4 to 8 °C for 2–3 years [32,68]. Due to the different production technologies (extraction, lyophilization, thermal drying, adsorption, stabilization, mixing), the preparations based on the drone brood have a non-permanent qualitative and quantitative composition, have different severity of nutritional and therapeutic properties, characterized by a different shelf life [16].

The usual daily dose recommend by apilarnil producers for adults is about 300 mg, which can be enlarged to 600–900 mg, if necessary [38]. However, toxicological studies are completely lacking in the available literature, nor adverse effect or toxic dose has been established. The only one study conducted in Russia reports the incidence of allergy towards drone brood application as 2.4% of tested population ($n = 41$) [69].

Conducting the research allowed to patent the recipes for supplements based on drone brood recommended to support the functioning of the organism. To find such practical solutions we used the worldwide Espacenet base which offer free access to over 120 million patent documents. The result list of advanced search for key words combination “drone” and “ brood” given 247 results, when the combination “drone” and “ brood” and “supplement” was used the results were limited to 75. The most interesting current applications which were filed within last 10 years, were summarized in chronological order in Table 5.

Table 5. Patents relating to the use of drone brood as an ingredient in supplements in the prevention/treatment of various health problems [<https://worldwide.espacenet.com/>].

No	Title	Applicants [Country]	Publication Number	Earliest Priority/Publication	Description
1	Insect protein-containing preparation and method for treating androgen deficiency in women	PARAFARM [RU]	UA140992U	2016-03-10/2020-03-25	The preparation for androgen deficiency in women contains a homogenate of brood and can be produced in the form of tablets, capsules or powder. The method of treating androgen deficiency in a woman is to administer the preparation in an amount of 10 mg to 600 mg per day.
2	Method of treating androgen deficiency in women	Kurkus' N.V. [RU] and 15 co-authors	US20170065646A1	2017-03-09/2018-05-22	The invention relates to biologically active food supplements and is intended for treating androgen deficiency in women and for preventive action against the states associated with osteoporosis. Powdered calcium carbonate mix with drone brood lyophilizate (9:1) in form of tablets. One capsule administration 3 times a day for the month separately from meals.
3	Method of producing bio preparation with nootropic activity	Budget Institution of Higher Vocational Education of the State Fed [RU]	RU2609872C1	2015-11-25/2017-02-06	The bio preparation of homogenizing bee brood drone larvae in cooled isotonic NaCl solution, boiling male bee brood larvae homogenate in order to denature proteins, removing sediment on a paper filter and cleaning with a membrane. The described method allows to obtain a peptide preparation with nootropic effect.
4	Method of treating osteoarthritis	PARAFARM [RU]	RU2593018C1	2015-10-28/2016-07-27	The invention "Osteomed forte" is using for the invention enables the reduction of the pain syndrome and motor dysfunctions in the joints of the hands and feet. Containing 20–1000 mg of drone brood in combination with vit. D in the amount of 100–50,000 IU, a calcium compound 40–1000 mg. Osteomed forte is taken in the amount of 1 tablet in the morning and evening, with 3-month treatments 3 times a year.
5	Composition for preventing and healing compromised bone and a method of making same	Andreeva E. S. [RU] and 17 co-authors	US2016339063A1	2009-11-30/2016-11-24	The biologically active additive composition comprises the selected pharmacologically active calcium compound in an amount of 16.67–93.75 wt.% and drone brood in an amount of 6.25–83.33% by weight. The application prevents and treats osteoporosis, bone fractures and cavities, arthritis, arthrosis, periodontitis, with a significantly reduced risk of calcium deposition in soft tissues.

Table 5. Cont.

No	Title	Applicants [Country]	Publication Number	Earliest Priority/Publication	Description
6	Application of adsorbed drone brood homogenate and group D vitamins and/or their active metabolites for prevention and treatment of acute respiratory diseases and flu	PARAFARM [RU]	RU2013130302A RU2564111C2 RU2564111C9	2013-07-03/2015-01-08	The proposed biologically active additive comprises adsorbed drone brood homogenate, the daily dose thereof lying between 75 mg and 500 mg, and vitamin or vitamins of group D and/or their active metabolites, a daily dose thereof between 25 IE and 50,000 IE.
7	Biologically active food additive for the prophylaxis of erectile dysfunction in men	PARAFARM [RU]	EP2687107A2	2012-10-04/2014-01-22	The product contains L-arginine and also drone brood with the following components: 50–96.2% by weight of L-arginine and 3.8–50% by weight of drone brood.
8	Coffee drink	PARAFARM [RU]	CA2840708A1 CA2840708C	2011-07-05/2013-01-10	Intended for prophylaxis and therapeutic prophylaxis in conditions associated with fatigue, and is in the form of a coffee or other drink and consists of: 1 part drone brood, 3–9 parts glucose and/or fructose, and 1–100 parts fillers (coffee or other drink in powder form).
9	Preparation and method for the prophylaxis and treatment of atypical osteoporosis	PARAFARM [RU]	US2015224150A1 US9827273B2	2012-04-19/2013-10-24	The preparation consists of 10 mg to 1000 mg daily of drone brood and 50 IU to 100,000 IU daily of vitamin D or vitamins of this group and/or their active metabolites can be supplied in a powder, tablet or capsule.
10	Medication for treatment and prevention urogenital system diseases in males	PARAFARM [RU]	RU2423142C1	2009-12-02/2011-06-09	Preparation contains drone brood with the following weight ratio of components: drone brood (powder) 25–75% naked licorice root (powder) 75–25%. Taking the drug stimulates the work of the glands, normalizes the reproductive system in men, has anti-inflammatory and anesthetic properties, normalizes urination and restores sexual functions.

The patented supplements are mainly recommended for the prevention and treatment of hormonal disorders in women and men or in a complex with calcium—for osteoporosis and arthritis. The proposed administration amount is very divergent, from 10 to 1000 mg per day. The majority of inventions come from Russia and are applied mainly by one company “Parapharm”, the manufacturer of innovative food supplements and ingredients, which nowadays possess 110 patents of Russia and foreign countries [70].

7. Conclusions

Drone brood is a rich in nutrients, little-known bee product which exhibits many beneficial healing and therapeutic properties. Since ancient times, it has been used as a cheap, safe and effective natural remedy against different diseases. Some of the biological and therapeutic effects of drone brood have been confirmed by performing laboratory and animal or human in vivo experiments. Unfortunately, scientists have only just begun to discover the many health benefits of consuming this little-known bee product. Only a few dietary supplements can be found in on-line sale. The dietary supplements based on drone brood were the subject of some filed patent coming mainly from Russia. Meanwhile, due to its high degree of hormonal activity, drone brood should be thoroughly examined in order to be safe used as a component of widely accepted pharmaceuticals in the future. Due to reported allergy incidents toxicological aspects of excessive use of drone brood should be considered.

Author Contributions: E.S. and M.D. conceived the idea. E.S. prepared the first draft of the review. M.D. revised and approved the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the University of Rzeszów research project PB/ZCHTZ/2020.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study.

References

1. Cherry, R.H. Use of insects by Australian Aborigines. *Am. Entomol.* **1991**, *37*, 8–13. [[CrossRef](#)]
2. Kruszewski, M.A.; Naumowicz, M. The importance of the honey bee (*Apis mellifera*) and bee products in human life. *Edu. Biol. Środowiskowa* **2017**, *47*–53. [[CrossRef](#)]
3. Krell, R. Value—Added from beekeeping. In *FAO Agricultural Services Bulletin No. 124*; FAO: Rome, Italy, 1996; pp. 409–411.
4. Finke, M.D. Nutrient composition of bee brood and its potential as human food. *Ecol. Food Nutr.* **2005**, *44*, 257–270. [[CrossRef](#)]
5. Ghosh, S.; Jung, C.; Meyer-Rochow, V.B. Nutritional value and chemical composition of larvae, pupae and adults of worker honey bee, *Apis mellifera* ligustica as a sustainable food source. *J. Asia Pac. Entomol.* **2016**, *19*, 487–495. [[CrossRef](#)]
6. Ghosh, S.; Sohn, H.Y.; Pyo, S.J.; Jensen, A.B.; Meyer-Rochow, V.B.; Jung, C. Nutritional composition of *Apis mellifera* Drones from Korea and Denmark as a potential sustainable alternative food source: Comparison between developmental stages. *Foods* **2020**, *9*, 389. [[CrossRef](#)]
7. Gheldof, N.; Wang, X.; Engeseth, N.J. Identification and quantification of antioxidant components from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5870–5877. [[CrossRef](#)]
8. Gessain, M.; Kinzler, T. Honey and honey making insects in the Bassari and other populations of Eastern Senegal. In *L’homme et L’animal*; Premier Colloque d’Ethnozoologie: Paris, France, 1975; pp. 247–254.
9. Mbata, K.J. Traditional use of arthropods in Zambia. I. The food insects. *Food Insects Newsl.* **1995**, *8*, 5–7.
10. Onore, G. A brief note on edible insects in Ecuador. *Ecol. Food Nutr.* **1997**, *36*, 277–285. [[CrossRef](#)]
11. Lou, Z.-Y. Insects as food in China. *Ecol. Food Nutr.* **1997**, *36*, 201–207.
12. Jensen, A.B.; Evans, J.; Jonas-Levi, A.; Benjamin, O.; Martinez, I.; Dahle, B.; Roos, N.; Lecocq, A.; Foley, K. Standard methods for *Apis mellifera* brood as human food. *J. Apic. Res.* **2019**, *58*, 1–28. [[CrossRef](#)]
13. Boes, K.E. Honeybee colony drone production and maintenance in accordance with environmental factors: An interplay of queen and worker decisions. *Insects Sociaux* **2010**, *51*, 1–9. [[CrossRef](#)]
14. Budnikowa, N.W. Biologically active compounds in drones. *Beekeeping* **2009**, *6*, 52–53. (In Ukrainian)
15. Prochoda, L.A. Apilarme products for functional nutrition. *Beekeeping* **2009**, *7*, 51–52. (In Russian)

16. Özkök, A.; Erdem, B. Can Food Supplement Produced from Apilarnil be an alternative to testosterone replacement therapy. *Hacetatepe J. Biol. Chem.* **2017**, *4*, 635–638. [[CrossRef](#)]
17. Sawczuk, R.; Karpinska, J.; Milyk, W. What do we need to know about drone brood homogenate and what is known. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *245*, 111581. [[CrossRef](#)]
18. Isidorov, V.A.; Bakier, S.; Stocki, M. GC-MS investigation of the chemical composition of honeybee drone and queen larva homogenate. *J. Apic. Sci.* **2016**, *60*, 111–120. [[CrossRef](#)]
19. Silici, S. Chemical Content and Bioactive Properties of Drone Larvae (Apilarnil). *Mellifera* **2019**, *19*, 14–22.
20. Wilde, J.; Bağ, B. Bee brood—An unconventional source of animal protein. *Biul. Nauk.* **2002**, *18*, 229–237.
21. De Oliveira, T.S.; Engels, W. Classification of substages in preimaginal development of honey bee drones (Hymenoptera: Apidae). *Entomol. Gen.* **2013**, *34*, 287–293. [[CrossRef](#)]
22. Czekońska, K.; Tofilski, A. Body mass of honey bee drones developing in constant and in changing temperatures. *Apidologie* **2010**, *51*, 510–518. [[CrossRef](#)]
23. Development of the Honey Bees—from the Egg to the Bee. Available online: <http://www.bee-info.com/biology-bee/development-tabular.html> (accessed on 10 August 2020).
24. Stangaciu, S.; Hartenstein, E. *Medicines from the Bee Pharmacy*; KDC: Warsaw, Poland, 2007; pp. 62–64. (In Polish)
25. Calderone, N.W. Evaluation of drone brood removal for management of Varroa destructor (Acari: Varroidae) in colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the northeastern United States. *J. Econ. Entomol.* **2005**, *98*, 645–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Sołodenko, J. *How to Properly Use Honey and Other Beekeeping Products. Drone Larvae Homogenate-Drone Milk*; Apimondia: Bucharest, Romania, 2015; pp. 14–15.
27. Czerkasowa, A.I.; Prochoda, I.O. *A New Addition of Drone Larvae—An Alternative to Royal Jelly*; NFaU: Kharkiv Oblast, Ukraine, 2006; pp. 65–69. (In Ukrainian)
28. Barnuti, L.I.; Marghitaș, L.A.; Dezmiorean, D.; Bobiș, O.; Mihai, C.; Pavel, C. Physico-chemical composition of apilarnil (bee drone larvae). *Lucr. Științifice Ser. Zoteh* **2013**, *59*, 199–202.
29. Komisar, O.D. *Homogenate of Drone Licks as a Sum of Erroneous Statements and Unresolved Issues*; NFaU: Kharkiv Oblast, Ukraine, 2006; Volume 6, pp. 87–92. (In Ukrainian)
30. Kryłow, W.N.; Agafonow, A.W.; Kriwcow, N.I. *Theory and Methods of Apitherapy*; GNU: Moscow, Russia, 2007; pp. 168–180. (In Russian)
31. Lebidiew, W.I.; Legowicz, M.A. Harvesting a drone license is profitable. *Beekeeping* **2003**, *6*, 52–53. (In Russian)
32. Bogdanov, S. Royal Jelly and Bee Brood: Harvest, Composition, Quality. In *The Royal Jelly Book*; Bee Product Science: Muethlethurnen, Switzerland, 2016; Available online: https://www.researchgate.net/publication/304012318_Royal_Jelly_and_Bee_Brood_Harvest_Composition_Quality (accessed on 20 August 2020).
33. Bałkańska, R.; Karadjova, I.; Ignatova, M. Comparative analyses of chemical composition of royal jelly and drone brood. *Bulg. Chem. Commun.* **2014**, *46*, 412–416.
34. Burmistrova, L.A. Composition and biological activity of drone brood. In *Problems of Ecology and Beekeeping Development in Russia*; Institute of Beekeeping: Rybnoe, Russia, 1999; pp. 156–159. (In Russian)
35. Lazaryan, D.S.; Sotnikova, E.M.; Ertushenko, N.S. Standardization of bee bread homogenate composition. *Pharm. Chem. J.* **2003**, *37*, 614–616. [[CrossRef](#)]
36. Isidorow, W.A. *The Alchemy of Bees*; Sąddecki Bartnik: Stróże, Poland, 2013; pp. 64–69. (In Polish)
37. Mandla, R.; Kumar, N.R. Comparison of carbohydrates in the worker, drone and queen brood food of *Apis mellifera* during spring. *J. Glob. Biosci.* **2016**, *5*, 3765–3768.
38. Kędzia, B.; Hołderna-Kędzia, E. *Less Known Bee Products*; Sąddecki Bartnik: Stróże, Poland, 2017. (In Polish)
39. Xu, X.; Gao, Y. Isolation and characterization of proteins and lipids from honeybee (*Apis mellifera* L.) queen larvae and royal jelly. *Food Res. Int.* **2013**, *54*, 330–337. [[CrossRef](#)]
40. Nabas, Z.; Haddadin, M.S.; Haddadin, J.; Nazer, I.K. Chemical composition of royal jelly and effects of symbiotic with two different locally isolated probiotic strains on antioxidant activities. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2014**, *64*, 171–180. [[CrossRef](#)]
41. Bogdanov, S. Honey composition. In *The Honey Book*; Bee Product Science: Muethlethurnen, Switzerland, 2011; Available online: https://www.researchgate.net/publication/304011775_Honey_Composition (accessed on 20 August 2020).
42. Lazaryan, D.S. Comparative amino acids analysis of bee bread. *Pharm. Chem. J.* **2002**, *36*, 680–682. [[CrossRef](#)]

43. Iliesiu, N. A modern preparation of bees “Apilarnil”. *Inf. Reg. Zrzesz. Pszczel. Apipol* **1988**, *10*, 15–20.
44. Narumi, S. Honeybee brood as a nutritional food. *Honeybee Sci.* **2004**, *25*, 119–124.
45. Racette, S.B.; Lin, X.; Lefevre, M.; Spearie, C.A.; Most, M.M.; Ma, L.; Ostlund, R.E., Jr. Dose effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism: A controlled feeding study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *91*, 32–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bornus, L. Beekeeping encyclopedia. *PWRiL* **1989**, *44*, 59–60.
47. Bolatovna, K.S.; Rustenov, A.; Eleuqalieva, N.; Omirzak, T.; Akhanov, U.K. Improving reproductive qualities of pigs using drone brood homogenate. *Biol. Med.* **2015**, *7*, 2.
48. Majewska, E.; Kowalska, J.; Drużyńska, B.; Wołosiak, R.; Derewiaka, D.; Ciecierska, M. Nutritional and antioxidant value of bee products. *Bromat. Chem. Toksykol.* **2016**, *3*, 360–364.
49. Cornara, L.; Biagi, M.; Xiao, J.; Burlando, B. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 1–20. [[CrossRef](#)]
50. Dżugan, M.; Tomczyk, M.; Sowa, P.; Grabek-Lejko, D. Antioxidant activity as biomarker of honey variety. *Molecules* **2018**, *23*, 2069. [[CrossRef](#)]
51. Shoinbayeva, K.B.; Omirzak, T.; Bigara, T.; Abubakirova, A.; Dauylbay, A. Biologically active preparation and reproductive function of stud rams. *Asian J. Pharm.* **2017**, *11*, 184–191.
52. Vasilenko, Y.K.; Klimova, O.V.; Lazaryan, D.S. Biological effect of drone brood under chronic hyperlipidemia conditions. *Pharm. Chem. J.* **2002**, *36*, 434–436. [[CrossRef](#)]
53. Vasilenko, Y.K.; Klishina, I.I.; Lazaryan, D.S. A comparative study of the immunotropic and hepatotropic action of beekeeping products in rats with drug- induced hepatitis. *Pharm. Chem. J.* **2005**, *39*, 319–322. [[CrossRef](#)]
54. Wyszynska, M.; Kabała-Dzik, A.; Szaflarska-Stojko, E. Observations on the hepatoprotective effect of DNA extract from bee brood. *Farm. Przegł. Nauk.* **2008**, *4*, 21–23.
55. Kabała-Dzik, A.; Smagacz, O.; Marquard, W. Shielding effect of bee brood in relation to embryotoxic compounds-acetylsalicylic acid. *Proc. Sci. Beekeep. Conf.* **2007**, *44*, 138–139. (In Polish)
56. Meda, A.; Lamien, C.E.; Millogo, J. Therapeutic uses of honey and honeybee larvae in central Burkina Faso. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *95*, 103–107. [[CrossRef](#)]
57. Osnicewa, L.A.; Efanowa, N.W.; Kabyszewa, W.W. Homogenate of drone in the diet of dogs. *Beekeeping* **2009**, *10*, 50–51. (In Ukrainian)
58. Bieljajew, W.A.; Safonowskaja, J.W. Adaptogenic relationship training based on drone brood. *Beekeeping* **2009**, *6*, 51–52. (In Russian)
59. Andrițoiu, C.V.; Andrițoiu, V.; Cuciureanu, M.; Nica-Badea, D.; Bibire, N.; Popa, M. Effect of apitherapy products against carbon tetrachloride induced toxicity in wistar rats. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **2014**, *55*, 835–847.
60. Liu, B.-J. *Nutritive Honey from Drone Chrysalis Study on Its Anticancerous Function*; Apimondia: Bucharest, Romania, 1995; p. 394.
61. Sljahow, P.; Cilevski, A.; Nastova-Dorijoska, R. *Drone Brood (Pilo) in Folk Medicine Applied Against Migraine, Obstipation and Strii by High Mountain Population in Macedonia*; Apimondia: Bucharest, Romania, 1998; p. 64.
62. Gorpiczenko, I.I.; Dobrowolska, L.I.; Muljawko, N.O. *Application of Preparations Based on Homogenates of Drone Larvae in the Treatment of Human Infertility*; NFaU: Kharkiv Oblast, Ukraine, 2012; pp. 47–57. (In Ukrainian)
63. Seres, A.B.; Ducza, E.; Báthori, M.; Hunyadi, A.; Béni, Z.; Dékány, M.; Gáspár, R. Raw drone milk of honeybees elicits uterotrophic effect in rats: Evidence for estrogenic activity. *J. Med. Food* **2013**, *16*, 404–409. [[CrossRef](#)]
64. Yucel, B.; Acikgoz, Z.; Bayraktar, H.; Seremet, C. The effects of Apilarnil (drone bee larvae) administration on growth performance and secondary sex characteristics of male broilers. *J. Anim. Vet. Adv.* **2011**, *10*, 2263–2266. [[CrossRef](#)]
65. Allen, M.D. The effect of a plentiful supply of drone comb on colonies of honeybees. *J. Apic. Res.* **1965**, *4*, 109–119. [[CrossRef](#)]
66. Czuchraj, T.M. Bee as much in this word. In *Beekeeping, Apitherapy and Phytotherapy in Human Hands*; Pchelovod: Simferopol, Russia, 2012; pp. 47–57. (In Russian)
67. Ulmer, M.; Smetana, S.; Heinz, V. Utilizing honeybee drone brood as a protein source for food products: Life cycle assessment of apiculture in Germany. *Resour. Conserv. Recycl.* **2020**, *154*, 104576. [[CrossRef](#)]
68. Burmistrova, L. *Physico-Chemical and Biological Appreciation of Drone Brood*. Ph.D. Thesis, Ryazan Medical University, Ryazan, Russia, 1999. (In Russian).

69. Smirnova, V. Allergy towards bee products. *Apitherapy Today* **2008**, *13*, 77–81. (In Russian)
70. Available online: <http://parapharm-russia.ru> (accessed on 26 November 2020).

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Załącznik nr 1 do uchwały nr 118/07/2022

Rady Naukowej Kolegium Nauk

Przyrodniczych dnia 12 lipca 2022 r.

Rzeszów, dnia ...6.04.2023r.....

Imię i nazwisko mgr inż. Ewelina Sidor

Jednostka Instytut Technologii Żywności i Żywienia,

Zakład Chemii i Toksykologii Żywności

Promotor prof. dr hab. inż. Małgorzata Dżugan

Promotor pomocniczy dr inż. Monika Tomczyk

OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, oświadczam niniejszym, że wkład mojej pracy naukowej (w ramach dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia), a tym samym pracy pozostałych współautorów w opublikowaniu poniższych artykułów, które zamierzam przedstawić jako własną dysertację doktorską jest następujący:

II. Ewelina Sidor, Michał Miłek, Grzegorz Zaguła, Aleksandra Bocian, Małgorzata Dżugan. *Searching for Differences in Chemical Composition and Biological Activity of Crude Drone Brood and Royal Jelly Useful for Their Authentication*. Foods 2021, 10, 2233.

- koncepcja pracy – współtworzenie zarysu pracy, zagadnień, które zostaną w niej poruszone, przeszukiwanie baz danych i zbiorów literatury
- zebranie i zabezpieczenie materiału badanego (czerw trutowy i mleczko pszczele)
- dostosowanie metodologii dotyczącej analiz wszystkich parametrów fizykochemicznych, antyoksydacyjnych, zawartości hormonów, białka rozpuszczalnego, enzymów do badanego materiału, wykonanie wymienionych analiz, opis wyników i dyskusja
- walidacja techniki chromatograficznej HPTLC
- przygotowanie ekstraktów do wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej
- przechowywanie uzyskanych wyników
- przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, doskonalenie zgodnie z uwagami promotora

.....Ewelina Sidor.....

Podpis

Oświadczenia współautorów

1. dr inż. Michał Miłek

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Ewelinę Sidor udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- wykonanie analiz profilu aminokwasowego, polifenolowego i cukrowego ekstraktów z czerwiu trutowego i mlecza pszczelego metodą HPTLC
- obróbka komputerowa uzyskanych chromatogramów i ich analiza



.....
Podpis

2. dr hab. inż. Grzegorz Zaguła prof. UR

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Ewelinę Sidor udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- dostosowanie metodologii do analizy biopierwiastków metodą ICP-OES i oznaczenia białka całkowitego metodą Dumasa w próbkach czerwiu trutowego i mlecza pszczelego
- walidacja metody ICP-OES oraz Dumasa
- analiza biopierwiastków i białka całkowitego w dostarczonych próbkach



.....
Podpis

3. dr hab. Aleksandra Bocian

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Ewelinę Sidor udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- dostosowanie metodologii do analizy profilu białkowego próbek czerwiu trutowego i mlecza pszczelego metodą elektroforezy SDS-PAGE
- wykonanie elektroforezy SDS-PAGE zgodnie z opracowaną metodyką
- analiza uzyskanych profili białkowych


Podpis

4. prof. dr hab. inż. Małgorzata Dżugan

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Ewelinę Sidor udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- koncepcja badań – nawiązanie kontaktów z pszczelarzami, którzy udostępnili materiał badany, dobór odpowiednich metod statystycznych
- bieżący nadzór nad wykonywanymi analizami aktywności enzymatycznej, analiza formalna uzyskanych wyników
- ocena w postęпах pisania pracy, udzielanie wskazówek mających na celu ulepszenie manuskryptu
- pozyskanie finansowania do opublikowania przygotowanego artykułu
- obowiązki autora korespondencyjnego


Podpis

Article

Searching for Differences in Chemical Composition and Biological Activity of Crude Drone Brood and Royal Jelly Useful for Their Authentication

Ewelina Sidor ¹, Michał Miłek ¹, Grzegorz Zaguła ², Aleksandra Bocian ³ and Małgorzata Dżugan ^{1,*}

- ¹ Department of Chemistry and Food Toxicology, Institute of Food Technology and Nutrition, University of Rzeszów, Ćwiklińskiej 1a St., 35-601 Rzeszów, Poland; ewelina.sidor@poczta.onet.pl (E.S.); mmilek@ur.edu.pl (M.M.)
- ² Department of Bioenergetics, Food Analysis and Microbiology, Institute of Food Technology and Nutrition, College of Natural Science, Rzeszów University, Ćwiklińskiej 2D St., 35-601 Rzeszów, Poland; g_zagula@ur.edu.pl
- ³ Department of Biotechnology and Bioinformatics, Rzeszów University of Technology, Powstańców Warszawy 6 St., 35-959 Rzeszów, Poland; bocian@prz.edu.pl
- * Correspondence: mdzugan@ur.edu.pl

Abstract: Drone brood is a little-known bee product which is frequently considered as a male equivalent of royal jelly and is sometimes used as its adulterant. The aim of the study was to compare the chemical composition and biological activity of both bee products originated from the same apiaries ($n = 3$) limiting the influence of genetic and environmental factors. Moreover, for drone brood study covered testing three stages of larval development (days 7, 11, and 14). The comparison included mineral composition (ICP-OES method), protein content and protein profile (SDS-PAGE), testosterone and estradiol content (ELISA tests). HPTLC method was used to analyze of sugar, amino acids, and polyphenolic profile of drone brood and royal jelly. Moreover, their antioxidant and enzymatic properties were compared. A lot of similarities between drone brood and royal jelly were found in terms of chemical components. However, drone brood was more abundant in iron and manganese, reducing sugars and some amino acids, especially proline, tyrosine, and leucine. It contained more testosterone (especially on the 14th day) and estradiol (on the 7th day). The greatest differences in the enzymatic activities and polyphenolic profile were found. Diastase and α -glucosidase activity were found as specific enzymes of the drone brood. Similarly, ferulic and ellagic acids were characteristic for brood and were not present in royal jelly. The study showed a lot of similar features for both tested bee products, however, some specific markers which can serve to differentiate drone brood and royal jelly were found.

Keywords: drone brood; royal jelly; minerals; sex hormones; antioxidant activity; enzymes; protein profile; HPTLC



Citation: Sidor, E.; Miłek, M.; Zaguła, G.; Bocian, A.; Dżugan, M. Searching for Differences in Chemical Composition and Biological Activity of Crude Drone Brood and Royal Jelly Useful for Their Authentication. *Foods* **2021**, *10*, 2233. <https://doi.org/10.3390/foods10092233>

Academic Editor: Olga Escuredo

Received: 6 August 2021

Accepted: 18 September 2021

Published: 21 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Since the end of the 20th century, beehive products have been more widely used in modern medicine as a curative and preventive remedy. Honey, pollen, royal jelly, and propolis are unique natural products, that contain balanced combinations of the most important biologically active components, which determine a wide range of their medicinal properties. It has been shown that in many biologically active beehive products, royal jelly is the most important one [1]. In turn, drone brood is a valuable bee product little known in the world, however with a long history of application in Romania and Russia [2].

Royal jelly (RJ) is a yellowish-white, creamy, acidic secretion from the mandibular and hypopharyngeal glands of young worker bees (the so-called nurses) of the *Apis mellifera* species [3]. It serves as the most important part of the honeybee larvae diet, including both worker and drone larvae, playing a major role in caste differentiation. This milk is fed to all

larvae in the bee colony for the first three days of life, and the queen to the entire larval stage. Scientific researchers have shown that royal jelly is a rich source of protein, carbohydrates, lipids, minerals, and vitamins, as well as female sex hormones. It was shown that royal jelly given to the mother larvae has a richer chemical composition (more sugars, juvenile hormones and acids) than that intended for other larvae [1,3]. Royal jelly lipids consist of fatty acids (90%), sterols, glycerides, and phospholipids. Among sugars, glucose, fructose, sucrose, ribose, and traces of glycogen were found. Proteins, including albumin, globulins, complex proteins, hormones and enzymes, make up the largest share of the composition of RJ. The numerous enzymes are divided into those involved in the synthesis of proteins and carbohydrate metabolism, associated with the oxidation and reduction processes or involved in lipid metabolism and transport. Among them, glycosidases belonging to the hydrolases group, constitute a diverse enzymes complex, related to the biogenesis, transport, and catabolism of glycoconjugates [4,5]. Royal jelly is also rich in macro- and microelements, vitamins of the B group, pantothenic acid, nicotinic acid, and inositol. Organic acids contained in RJ cause acidic conditions (pH 4.1–4.8) [6].

The abundance and variety of bioactive compounds occurring in royal jelly are responsible for its multiple physiologic activities and medical applications. The beneficial effects as a result of the ingestion of RJ through capsules, tablets, or other preparations are based on experimental studies in which the group was treated with a placebo [7]. Several pharmacological properties have been attributed to RJ mainly among which are antioxidant activity, due to hormones, enzymes used in healthy foods, the pharmaceutical industry or cosmetics [8,9].

In turn, drone brood (DB) is a bee product gaining more and more popularity, often referred to as the male equivalent of royal jelly. This assumption is based on the similarity in the chemical composition of both RJ and DB products. However, its origin is completely different. The drone brood is collected from beehives as young male larvae, usually between days 4 and 14 of development [2]. As DB can be easily obtained in large quantities, it is used to counterfeit royal jelly [9–11].

Drone brood is a viscous yellowish liquid with a pleasant odor, which contains a large number of beneficial substances for humans. The chemical composition of drone brood homogenate is characterized by the presence of proteins, amino acids, nucleic acids, enzymes, and phospholipids. The complex of biologically active substances of drone brood determines the number of pharmacological characteristics of these bee products, in particular, the antioxidant, immunotropic, adaptogenic, and anabolic actions. Drone brood is characterized by the presence of enzymes with a large number of functional groups, as well as hormones [2,12]. Drone brood homogenate is unstable during storage and requires additional stabilization to maintain the biological activity of the active substances for a long time. Different methods are used to stabilize biologically active substances in preparations based on drone brood homogenate. Although drone brood is a little-known product of beekeeping, it has long been used as a cheap, safe, and effective natural remedy against various diseases [13,14].

So far, preliminary studies have been carried out on the chemical composition and biological activity of drone brood which prove the high content of nutrients, bioelements, enzymes, and sex hormones. However, there are still no detailed studies of the chemical composition comparing the drone brood to royal jelly which is a well-tested bee product. The aim of the work was to compare the chemical composition of drone brood collected at various stages of development with royal jelly and to find the specific chemical markers to distinguish between the two products.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

The chemicals [2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine], reagents (Folin–Ciocalteu reagent), standards: ferulic acid, ellagic acid, proline, tyrosine, glycine, lysine, histidine, leucine, aspartic

acid, valine were obtained from Sigma Aldrich (St., MO, USA), Elisa kits for testosterone and estradiol from AbbeXa (Cambridge, UK) and buffer components (chloroform, ethyl acetate, formic acid, ethanol, 1-butanol, 2-propanol, boric acid) were purchased from Avantor Performance Materials Poland SA (APM, Gliwice, Poland).

2.2. Material Collection

Samples of drone brood (7-, 11-, 14-day-old; $n = 9$) and royal jelly ($n = 3$) were collected from the three apiaries (localized at least 50 km apart) in the south-eastern part of Poland (50.31° N, 21.26° E; 50.03° N, 22.93° E; 50.30° N, 22.25° E) in the June 2020 season. The drone brood (50 g from each sample) of the *Apis mellifera carnica* breed families were selected by hand from the drone frame, immediately sealed in sterile containers and transferred to the laboratory. The 7-, 11- and 14-day-old larvae were collected (Figure 1).

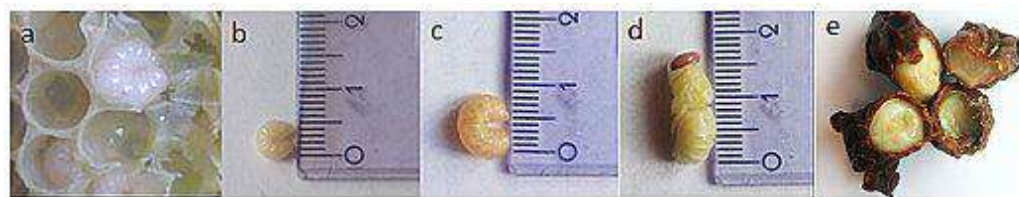


Figure 1. The size of drone larvae at various stages of development: (a) 7-day male larva in the comb cell, (b) 7-day-old larva, (c) 11-day-old larva, (d) 17-day old pupa, (e) royal jelly.

Each sample was homogenized using a tissue homogenizer (TH 02, Omni International, Kennesaw, GA, USA) with 7 mm Omni Tips™ plastic tips. The material was then frozen at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. The collection of royal jelly consisted in extracting the queen cells from the whole combs, which was then cut, and royal jelly was collected with a metal spatula into Eppendorf tubes. The material was immediately frozen at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3. Preparation of Drone Brood and Royal Jelly Extracts

Half a gram of frozen drone brood or royal jelly sample was extracted with 5 mL of distilled water. The samples were homogenized with a tissue homogenizer (TH 02, Omni International, USA) for two minutes at medium speed (15,000 rpm). The extracts were then centrifuged for 20 min at 10,000 rpm at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ using a refrigerated centrifuge (MPW-351R, Med. Instruments, Warszawa, Poland). The supernatants were collected and then filtered through a $0.45\text{ }\mu\text{m}$ nylon syringe filter and stored in a refrigerator at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further analysis but not longer than 3 days. Before antioxidant activity tests, the extracts were diluted 10-fold.

2.4. Determination of the Physicochemical Properties of Drone Brood and Royal Jelly

2.4.1. Water Content

One gram of the analyzed bee product was weighed on an aluminum plate. Water content was determined in a moisture analyzer (MA 50/1.R, RADWAG, Radom, Poland). A gentle drying profile of $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ with an accuracy of 1 mg/25 s was set. The measurement was performed in triplicate.

2.4.2. Refractive Index

The determination of the refractive index was done by the refractometric method, using an electronic refractometer HI96800 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA). The value of the refractive index was determined at room temperature with accuracy to the third decimal place. The determinations were made in triplicate.

2.4.3. Active and Free Acidity

To determine active acidity, a pH measurement of 20% solutions of drone brood and royal jelly in distilled water was performed using a CP-401 pH meter (Elmetron, Zabrze,

Poland). To determine the free acidity, 50 mL of 20% appropriate extract was titrated by 0.1 M NaOH to reach a pH of 8.3 measured by pH meter. The results were expressed in mval/g (mL 0.1N NaOH/g) of wet weight (WW).

2.4.4. Conductivity

To determine the specific electrical conductivity, 20% solutions of drone brood and royal jelly in distilled water were used. The conductivity of each sample was determined by immersing the electrode in the test solution. Each sample was measured three times. The conductivity of each product solution was measured using a conductometer CP-401 (Elmetron, Zabrze, Poland) and the results (in mS/cm) were presented.

2.4.5. Protein Analyses

Total Protein

Total protein was determined based on nitrogen content using carbon/hydrogen/nitrogen analyzer TruSpec (LECO, Saint Joseph, MI, USA), which is based on the Dumas dry combustion technique. The homogenized material was directly suspended to CHN analyzer according to ISO 16948:2015-07. Obtained nitrogen percentage (N) was calculated into protein content (%) by an adequate multiplier 6.25 [15,16].

Soluble Protein Fraction

Soluble protein fraction was determined by Bradford method in DB and RJ extracts prepared according to Latimer [16]. Appropriately diluted samples (5 μ L) were combined with 250 μ L Bradford reagent (G-250) in a 96-well microplate. Samples were incubated for 5 min at room temperature and the absorbance was read at 595 nm using a microplate reader (EPOCH 2, BioTek, Winooski, VT, USA). The results were calculated on the basis of a calibration curve 0–100 μ g/per sample ($y = 0.0551x$, $R^2 = 0.9991$). Bovine albumin was used as a standard protein.

Protein Profiling by SDS-PAGE

For protein precipitation with acetone, 1 g of drone brood or royal jelly was diluted with deionized water in 1:1 proportion (w/w) and 5 volumes of pure acetone were added. After 12 h of precipitation at -4 °C, tubes were centrifuged for 30 min at $10,000 \times g$ and pellets were dried in the open air. For salting out, samples were five times diluted with deionized water (w/w) and precipitated on a magnetic stirrer with the use of solid ammonium sulfate up to the final concentration of 4 M. The samples were then centrifuged for 30 min at $10,000 \times g$. Dialysis was performed on samples diluted with deionized water in 1:1 proportion (w/w) in D-Tube™ Dialyzer Maxi (MWCO 3.5 kDa, Merck Millipore, Burlington, MA, USA) for 24 h against deionized water, changed every 8 h. All samples after isolation were finally dissolved in 500 μ L of standard Laemmli buffer and protein concentration was measured using 2D Quant Kit (80-6483-56, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) in two technical repeats with the BSA as a standard in accordance with the manufacturer's instructions. Samples containing 25 μ g of protein were incubated for 5 min at 95 °C and after cooling were applied to 17.5% denaturing gels (with 5% stacking gels). Electrophoresis was carried out initially at 150 V (15 min) and then at 250 V for 2.5 h with cooling on an Omni PAGE WAVE Maxi apparatus (Cleaver Scientific Ltd., Rugby, Warwickshire, UK) according to the standard method of Laemmli. After electrophoresis, all gels were stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 overnight and then washed for 24 h with deionized water in order to remove the remains of the dye. Gels were scanned with Image Scanner III (GE Healthcare) and processed by LabScan 6.0 (GE Healthcare). Analysis of the gels was performed in ImageJ (1.52a) software by generating graphs representing each lane on the gel [17,18].

2.4.6. Mineral Composition of Bioelements Using the ICP-OES Method

Assessment of selected minerals (Na, K, Ca, Mg, P, S, Fe, Mn, Zn, Cr, Cu, Sr, As) and the toxic metals (Al, Cd, Pb) were determined by optical emission spectrometry with

inductively-induced plasma (ICP-OES) using a Thermo iCAP 6500 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). The detection limit for each element was determined at a level that was not lower than 1 µg/L. A curve fit factors (R^2) for all the elements studied were above 0.99. All the analyses were undertaken in three independent replications for each sample. The targeted repeatability expressed as the relative standard deviation (RSD) and targeted recovery were 92–106%, respectively. The method was validated using certified reference material (INCT-TL-1 tea leaves and NIES CRM No. 7 Tea Leaves). The response from the equipment was periodically checked with known standards. In order to identify the relevant measurement lines and avoid possible interferences, the method of adding an internal standard was applied. Yttrium and ytterbium ions were used as internal standards.

2.5. Hormonal Activity Determination

The activity of testosterone and estradiol in tested bee products was demonstrated with the use of immunoenzymatic ELISA Test Kits (abx574169 for estradiol and abx574314 for testosterone), strictly according to the manufacturer's manual (Abbexa, Cambridge, UK). In total, 50 µL of appropriately diluted sample was added into the test sample wells. Immediately after, 50 µL reagent A was added. After an hour of incubation at 37 °C and a three-time wash with buffer, 100 µL of reagent B was added. The plate was incubated for another 45 min at 37 °C. The washing process was repeated (5 times), then 90 µL of TMB substrate was added to each well and incubated at the same temperature for 20 min, protected from light. A 50 µL stop solution was added and the absorbance was immediately measured at 450 nm [19,20].

2.6. Antioxidants Assay

2.6.1. DPPH Test

The inhibition of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radicals was measured according to the method previously used in our laboratory for honey analysis with slight modifications. In total, 20 µL of the appropriately diluted extract was mixed with 180 µL of DPPH radical methanolic solution (0.1 mM) and kept in the dark for 30 min. After incubation, the absorbance was measured at 517 nm in a microplate reader EPOCH 2. The reduction of DPPH radicals was calculated using the following equation:

$$AA\% = [(A_o - A_s) / A_o] \times 100,$$

where A_o is the absorbance of the control and A_s is the absorbance of the tested samples. As positive control Trolox methanolic solution was applied (exhibited 56.5% scavenging activity in 10 mg/mL concentration).

2.6.2. FRAP Test

The FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) test was performed according to Džugan et al. [21]. The FRAP reagent contained 2.5 mL of a 10 mM solution of 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) in 40 mM HCl, 2.5 mL of 20 mM $FeCl_3$ and 25 mL of 0.3 M acetate buffer (pH 3.6). To 20 µL of diluted extract, 180 µL of FRAP reagent was added and after incubation at 37 °C for 10 min the absorbance of the reaction mixture was measured spectrophotometrically at 593 nm (EPOCH 2) against a blank. Results were expressed as mmol Trolox equivalents (TE) per 100 g of appropriate sample (mmol/100 g) from the calibration curve prepared for Trolox in the range 5–60 nmol/mL ($y = 0.152x$, $R^2 = 0.9989$).

2.6.3. Total Phenolic Content (TPC) Determination

The total content of phenolic compounds was determined using the Folin–Ciocalteu reagent according to Džugan et al. [21] adapted to use microplates analyses. To 20 µL of diluted appropriate extract 100 µL of 10% Folin–Ciocalteu reagent was added followed by 80 µL of 7.5% (*w/v*) sodium carbonate solution. The samples were kept in the dark for 60 min and then the absorbance was measured against the blank at 760 nm using microplate

reader EPOCH 2. The total content of phenolic compounds was expressed in mg of gallic acid equivalents (GAE) per 100 g of appropriate sample (mg GAE/100 g). The results were calculated based on a calibration curve prepared for gallic acid in the range 0–125 µg/mL ($y = 0.336x$, $R^2 = 0.9914$).

2.6.4. Total Flavonoid Content (TFC) Determination

The total content of flavonoids in the appropriate extracts was assessed using the method of Biju [22]. In total, 100 µL of the undiluted extract was mixed with 100 µL 2% $AlCl_3$ (in methanol). The reaction mixture was incubated for 10 min at room temperature until the completion of the reaction. The absorbance of the solution was then measured at 415 nm with a microplate reader EPOCH 2 against methanol blank. The total content of flavonoids in the extracts of drone brood was expressed in mg of quercetin equivalent (QE) per 100 g of brood sample (mg QE/100 g). The results were calculated on the basis of a calibration curve prepared for quercetin in the range 0–125 µg/mL ($y = 0.0655x$, $R^2 = 0.9999$).

2.7. HPTLC Analysis

Comparative analysis of polyphenolic, sugar and amino acid profiles for water extracts of the drone brood and royal jelly samples were performed on HPTLC Silica Gel 60 F₂₅₄ plates (20 × 10 cm) purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Chosen extracts of drone brood and royal jelly showing the best results in previous analyses were applied to the plate (40 µL for polyphenolic, 5 µL for sugars and amino acids) as 10 mm bands from the lower edge of the plate at the rate of 100 nL/s using a semi-automated HPTLC application device (Linomat 5, CAMAG, Muttenz, Switzerland) (Table 1).

Table 1. Details of separations performed on HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄.

Identified Group	Mobile Phase (v:v:v)	Derivatization Reagent	Used Standards
Polyphenolics	Chloroform:ethyl acetate:formic acid (5:4:1)	p-anisaldehyde-sulfuric acid reagent	Ferulic acid, ellagic acid
Sugars	1-propanol:1-butanol:boric acid 5 mg/mL H ₂ O (3:5:1)	p-anisaldehyde-sulfuric acid reagent	Glucose, fructose, trehalose, melezitose, sucrose, turanose, maltose
Amino acids	1-butanol:acetic acid:water (3:1:1)	Ninhydrin in ethanol (2 mg/50 mL)	Proline, tyrosine, glycine, lysine, histidine, leucine, aspartic acid, valine

The chromatographic separation was performed in a chromatographic tank saturated for 20 min with the mobile and developed to a distance of 70 mm. The obtained results were documented using an HPTLC imaging device (TLC Visualizer, CAMAG) under white light, UV 254, and 366 nm. In addition, each plate was derivatized using an automated derivatizer of TLC plates (CAMAG Derivatizer). After derivatization, the plates were imaged under white light and 366 nm. The obtained chromatographic images were analyzed using the HPTLC software (Vision CATS, CAMAG).

2.8. Enzymatic Activity Assay

The activities of the following acid glycosidases in water extracts of the drone brood and royal jelly samples were determined: N-acetyl-D-hexosaminidase (HEX), α-D-galactosidase (α-GAL), β-D-galactosidase (β-GAL), α-D-mannosidase (α-MAN), β-D-mannosidase (β-MAN), α-D-glucosidase (α-GLU), β-D-glucosidase (β-GLU). Moreover, acid and alkaline phosphatases were tested. Enzymatic assays were performed according to the method described by Barrett and Heath [23] based on absorbance measurements at 400 nm of enzymatically released p-nitrophenol (p-NP) from suitable p-NP-glycosides (Sigma Aldrich, St., MO, USA). Briefly, mixtures containing 50 µL of diluted enzyme sample and 50 µL of 2 mM appropriate p-NP substrate in 0.2 M citrate buffer at optimum pH (4.0 for β-GAL, α-GAL, and β-GLU; 5.0 for HEX, α-MAN, β-MAN, α-GLU, and acid phosphatase) were

incubated at 37 °C. For alkaline phosphatase determination 0.1 M glycine/NaOH buffer pH 10.5 was used. The reaction was terminated by the addition of 1M Na₂CO₃/NaHCO₃ (250 µL) or in the case of acid and alkaline phosphatase 0.25 M and 0.1 M NaOH, respectively. Absorbance was measured using microplate spectrophotometer EPOCH 2 at 400 nm. Results were expressed as enzymatic units U (µmol/g/min). One unit (U) was defined as the enzyme activity hydrolyzing 1 µmol of substrate per min at 37 °C at the optimal pH conditions [23].

The optimum pH for the tested glycosidases was determined by incubating diluted samples of royal jelly or drone brood with the substrate and 0.1M citrate buffer of pH ranging from 2.5 to 7.0 at 37 °C for 10–60 min. After this time, the reaction was stopped by the addition of 1 M carbonate buffer. Absorbance was measured using microplate spectrophotometer EPOCH 2 at a wavelength of 400 nm [23].

The thermostability of selected enzymes from the brood and royal jelly was determined by mixing 1 mL of the respective sample with 1 mL of buffer (0.1 M citrate buffer, pH 4.0 and 6.0). The settings were incubated for 120 min in a bath (60 °C), with 250 µL of mixture taken before insertion into the bath. The same aliquots were taken after 5, 15, 30, 60, and 120 min of incubation consecutively and were cooled in ice water at once. Then, the activity in all collected fractions was determined in standard conditions [23].

α-amylase was determined by a spectrophotometric method with the Phadebas Diastase test (Magle AB, Lund, Sweden) according to the manufacturer's instructions. A total of 5 mL of a 1% appropriate bee product solution in 0.1 M acetate buffer pH 5.0 was incubated for 5 min at 40 °C in a water bath. A Phadebas Diastase test tablet was then added to each sample and after thorough mixing, incubated at 40 °C for 30 min. Then, 1 mL of 0.5 M NaOH was added, mixed, and filtered into tubes and the absorbance of the filtrate was measured at wavelength 620 nm against a blank (acetate buffer) using a Biomate 3 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). One unit (U) was defined as the enzyme activity causing the increase of the absorbance of 0.1 in experimental conditions.

2.9. Statistical Analysis

All calculations were made in triplicate unless otherwise indicated. For the obtained data, mean values were calculated. Significant differences were calculated by one-way analysis of variance followed by Tukey's test of significant difference ($p < 0.05$). All calculations were made using the Statistica 13.3 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

3. Results

3.1. Physicochemical Properties of Drone Brood and Royal Jelly

In the first step of the study, the physicochemical properties of crude drone brood and royal jelly collected from three apiaries were determined. The comparison covered DB at three different stages of larval development (days 7, 11, and 14). The results are presented in Table 2.

In this report, the analyzed bee products showed a slightly different water content, the mean value for drone brood was 3.4% higher than in the royal jelly ($p < 0.05$). Moreover, the 14-day-old drone brood showed the highest content of water. Significant differences were found in the activity of hydrogen ions (pH) in the tested products. Drone brood showed significantly higher pH compared to royal jelly ($p < 0.05$). The highest pH was found for DB in 11 day of development, however, the development stage did not influence the pH of the DB samples significantly. A similar relationship was observed for the conductivity of the extracts. Drone brood was characterized by a significantly higher acidity by over 50% compared to royal jelly, and the differences regarding the development stage were not statistically significant. Checking the refractive index, the differences were found between DB and RJ samples only, but the differences were not statistically significant ($p > 0.05$).

Table 2. Physicochemical properties and mineral composition of drone brood (7-, 11-, 14-day-old) and royal jelly. The range and mean value for three samples obtained from various apiaries are shown.

Physicochemical Composition Min–Max (Mean)					
	Drone Brood			Royal Jelly (<i>n</i> = 3)	
	7-day-old (<i>n</i> = 3)	11-day-old (<i>n</i> = 3)	14-day-old (<i>n</i> = 3)	Mean (7–14-day-old)	
Water content [%]	69.6–70.3 (69.9) ^a	69.4–72.8 (71.6) ^a	68.7–73.1 (71.9) ^a	71.1 ^A	65.4–69.0 (68.4) ^{aA}
pH	6.52–6.58 (6.53) ^b	6.62–6.70 (6.66) ^b	6.58–6.78 (6.63) ^b	6.60 ^A	3.97–3.98 (3.97) ^{aB}
Acidity [mval/g WW]	10.0–18.0 (13.3) ^b	10.0–18.5 (14.3) ^b	9.90–19.0 (14.4) ^b	14.0 ^B	6.30–6.50 (6.36) ^{aA}
Conductivity [mS/cm]	0.03–0.04 (0.03) ^a	0.03–0.04 (0.03) ^a	0.03–0.04 (0.03) ^a	0.03 ^A	0.03–0.04 (0.03) ^{aA}
Refractive index [<i>n</i> _D]	1.337–1.339 (1.338) ^a	1.337–1.339 (1.338) ^a	1.337–1.339 (1.338) ^a	1.338 ^A	1.340–1.342 (1.341) ^{aA}
Macroelements min–max (mean) [mg/100 g WW]					
Na	6.45–10.27 (8.73) ^b	8.63–26.09 (6.99) ^a	7.32–9.93 (8.40) ^b	8.04 ^A	10.3–13.8 (12.0) ^{cB}
K	276.06–337.06 (287.32) ^a	240.96–313.99 (286.36) ^a	259.30–314.32 (292.58) ^a	288.75 ^A	321.1–357.4 (391.0) ^{bB}
Ca	15.16–21.02 (17.77) ^b	8.91–57.05 (27.98) ^d	8.13–17.47 (12.52) ^a	19.42 ^A	22.8–24.0 (23.5) ^{cB}
Mg	29.21–34.02 (32.04) ^a	15.25–33.24 (26.18) ^a	21.02–122.73 (56.57) ^c	38.26 ^A	44.0–50.4 (47.2) ^{bB}
P	296.69–324.02 (302.40) ^a	212.22–348.70 (287.92) ^a	267.26–351.35 (316.21) ^b	302.17 ^A	338.4–412.1 (375.0) ^{cB}
S	392.37–99.27 (96.30) ^b	53.33–100.99 (75.85) ^a	99.27–126.87 (110.39) ^c	94.18 ^A	153.2–169.3 (161.2) ^{dB}
Microelements min–max (mean) [mg/100 g WW]					
Fe	1.17–1.23 (1.20) ^b	0.57–1.17 (0.93) ^a	1.29–1.62 (1.41) ^c	1.18 ^A	n.d.
Mn	0.21–0.45 (0.33) ^c	0.27–0.33 (0.21) ^b	0.06–0.39 (0.18) ^a	0.24 ^B	0.01–0.08 (0.05) ^{aA}
Zn	41.44–1.71 (1.56) ^b	0.89–1.80 (1.29) ^a	1.14–2.04 (1.49) ^{ab}	1.44 ^A	2.07–2.58 (2.32) ^{cB}
Cr	0.01–0.03 (0.02) ^a	0.00–0.03 (0.01) ^a	0.02–0.07 (0.04) ^a	0.02 ^A	0.03–0.15 (0.09) ^{aA}
Cu	0.29–0.44 (0.36) ^b	0.15–0.39 (0.27) ^a	0.32–0.38 (0.35) ^b	0.32 ^A	0.31–0.39 (0.33) ^{abA}
Other min–max (mean) [mg/100 g WW]					
Sr	0.00–0.006 (0.004) ^a	0.00–0.18 (0.06) ^a	0.00–0.006 (0.003) ^a	0.022 ^A	n.d.
As	0.00–0.002 (0.03) ^a	0.00–0.006 (0.003) ^a	0.003–0.003 (0.003) ^a	0.003 ^A	0.01–0.09 (0.04) ^{aB}
Contaminants min–max (mean) [mg/100 g WW]					
Al	0.39–0.64 (0.48) ^a	0.48–1.19 (0.76) ^b	0.54–1.15 (0.93) ^c	0.62 ^A	0.48–3.35 (0.64) ^{bA}
Cd	0.003–0.003 (0.003) ^a	0.00–0.007 (0.003) ^a	0.00–0.003 (0.0003) ^a	0.0021 ^A	n.d.
Pb	0.00–0.005 (0.003) ^a	0.00–0.004 (0.004) ^a	0.003–0.006 (0.003) ^a	0.0033 ^A	0.04–0.07 (0.02) ^{aA}

^{a,b,c,d}—results marked with a different superscript in the rows are significantly different (Tukey's test, $p < 0.05$). ^{A,B}—results marked with a different superscript between royal jelly and mean value of drone brood are significantly different (Tukey's test, $p < 0.05$).

The research showed that both drone brood and royal jelly are rich sources of bioelements. However, the royal jelly contained slightly higher values for all tested minerals, excluding iron and manganese. Among the identified macroelements, the highest content in DB was found for phosphorus and potassium. In the analyzed bee products, comparable contents were found for sodium, calcium, and magnesium, however, the differences were statistically significant ($p < 0.05$). The lowest value of macronutrient in drone brood was found for sodium. Among microelements, the highest level was found in the case of zinc. Slightly lower concentrations of manganese and iron were identified, while no iron was found in royal jelly. In addition, trace amounts of contaminants such as lead and cadmium were identified in the drone brood, and a higher content was found in the case of aluminum similar in both tested products.

3.2. Total Protein and Soluble Protein Fraction

Using CHN combustion elemental analysis the total carbon, hydrogen, and nitrogen contents in DB and RJ were compared (Table 3). Based on total nitrogen assayed by Dumas method, the total protein content was calculated using a 6.25 multiplier. An insignificant difference between DB and RJ was found ($p > 0.05$). Moreover, protein content in DB was not changed between the tested stages of development. The comparative analysis of drone brood and royal jelly soluble protein concentration was determined by the Bradford method based on the formation of a dye–protein complex (Table 3). Despite the increase in the development stage of drone brood larvae, the content of water-soluble proteins was significantly lower than that of royal jelly ($p < 0.05$).

Table 3. Results of CHN analysis, calculated total protein content and soluble protein content measured by Bradford method for drone brood and royal jelly.

	Drone Brood			Royal Jelly (<i>n</i> = 3)	
	7-day-old (<i>n</i> = 3)	11-day-old (<i>n</i> = 3)	14-day-old (<i>n</i> = 3)	Mean (7–14-day-old)	
CHN elemental analysis					
C [%]	16.49–16.70 (16.58) ^b	16.49–16.60 (16.54) ^b	15.92–16.99 (16.57) ^b	16.56 ^B	13.23–14.06 (13.64) ^{aA}
H [%]	2.09–2.12 (2.11) ^a	2.06–2.12 (2.10) ^a	2.12–2.17 (2.14) ^a	2.11 ^A	2.89–2.41 (2.15) ^{aA}
N [%]	2.08–2.25 (2.16) ^a	2.12–2.35 (2.25) ^a	2.01–2.34 (2.21) ^a	2.20 ^A	2.02–2.89 (2.45) ^{aA}
Total protein [%]	12.52–13.53 (12.99) ^a	12.75–14.17 (13.54) ^a	12.09–14.09 (13.31) ^a	13.28 ^A	10.43–18–14 (14.12) ^{aA}
Soluble protein [%]	3.30–4.20 (3.41) ^a	4.19–4.57 (4.32) ^b	4.48–4.72 (4.63) ^b	4.12 ^A	6.88–7.96 (7.28) ^{cB}

^{a,b,c}—results marked with a different superscript in the rows are significantly different (Tukey's test, $p < 0.05$). ^{A,B}—results marked with a different superscript between royal jelly and mean value of drone brood are significantly different (Tukey's test, $p < 0.05$).

Proteomic Identification of Drone Brood and Royal Jelly Using SDS PAGE

A series of electrophoretic separations were carried out for selected specimens of drone brood at various stages of development and royal jelly. The analysis was carried out on samples of drone brood and royal jelly showing the best results in previous analyses (Figure 2).

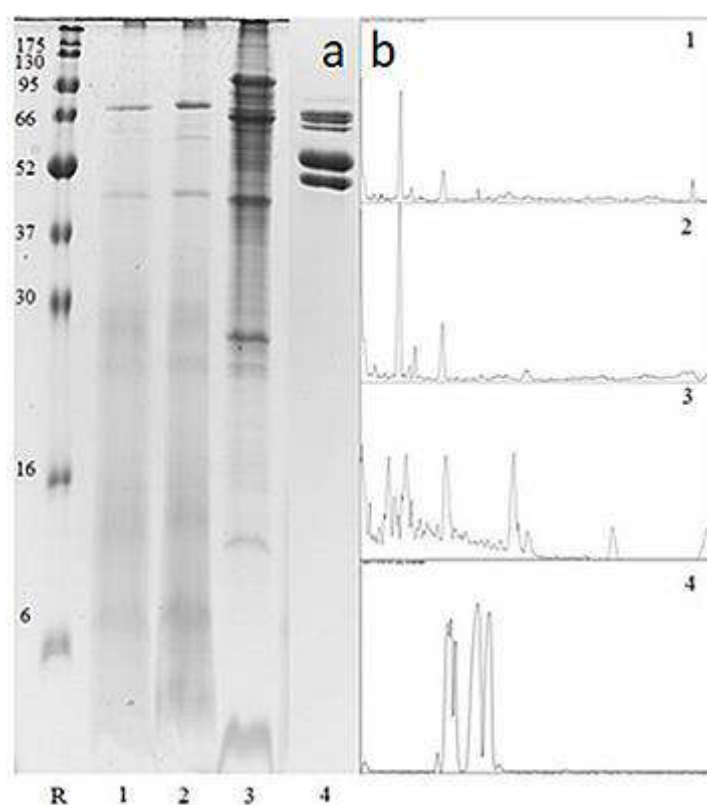


Figure 2. Gels obtained after protein SDS-PAGE of selected drone brood and royal jelly sample (a) and line plots of the respective gel lines generated with program ImageJ (1.52a) software (b). R-BlueEasy Prestained Protein Ladder (Nippon Genetics Co., Ltd., Tokyo, Japan)—protein molecular weight marker (kDa); (1) 7-day-old drone brood, (2) 11-day-old drone brood; (3) 14-day-old drone brood; (4) royal jelly.

The obtained protein maps (Figure 2) clearly show that the proteome of the drone brood depended on the stage of development and was completely different from the royal jelly protein profile. All three drone brood samples (regardless of development stage) have a distinct band at the level of approx. 28 and 12 kDa and 14-day-old drone brood were clearly distinguished by the occurrence of a specific band of 8 kDa. On the other hand, royal jelly contains six major protein fractions with a weight range of 50–90 kDa.

3.3. Biological Activity

3.3.1. Antioxidant Activity Determination

The analysis of the antioxidant and hormonal activity of aqueous extracts of drone brood and royal jelly was carried out using the DPPH and FRAP methods (Table 4).

Table 4. Antioxidant activity (DPPH, FRAP), total phenolic (TPC), and total flavonoids as well as hormonal content of analyzed drone brood and royal jelly.

Antioxidant Activity:	Drone Brood				Royal Jelly (<i>n</i> = 3)
	7-day-old (<i>n</i> = 3)	11-day-old (<i>n</i> = 3)	14-day-old (<i>n</i> = 3)	Mean (7–14-day-old)	
DPPH [%]	9.2–16.36 (12.95) ^b	6.91–24.76 (16.82) ^c	10.43–16.98 (13.60) ^{bc}	14.45 ^B	7.94–11.03 (10.52) ^{aA}
FRAP [μ mol TE/100 g]	0.80–1.16 (0.97) ^b	0.79–1.27 (1.04) ^b	0.86–1.63 (1.03) ^b	1.01 ^B	0.18–0.20 (0.19) ^{aA}
TPC [mg GAE/100 g]	234.62–268.84 (267.57) ^c	180.05–320.43 (259.79) ^c	200.89–285.21 (234.12) ^b	253.82 ^B	181.54–191.96 (189.72) ^{aA}
TFC [mg/100 g]	6.71–9.92 (8.94) ^a	10.30–13.0 (11.42) ^b	4.12–9.80 (7.46) ^a	9.27 ^A	10.7–11.9 (11.3) ^{bB}
Hormonal activity					
Testosterone [nmol/100 g]	0.47–1.10 (0.79) ^a	3.64–3.96 (3.80) ^b	8.24–9.10 (8.67) ^c	4.42 ^B	0.64–0.72 (0.68) ^{aA}
Estradiol [nmol/100 g]	653.70–680.26 (664.75) ^d	332.37–370.45 (355.67) ^c	217.90–274.16 (248.78) ^b	426.06 ^B	94.12–116.03 (106.46) ^{aA}

^{a,b,c,d}—results marked with a different superscript in the rows are significantly different (Tukey's test, $p < 0.05$). ^{A,B}—results marked with a different superscript between royal jelly and mean value for drone brood are significantly different (Tukey's test, $p < 0.05$).

The analysis of the DPPH radical scavenging capacity showed on average 27% higher activity of the drone brood compared to royal jelly, in the same concentration (10 mg/mL). A similar relationship was found by testing the activity with the FRAP method. Drone brood was more than 50% active than that of the royal jelly. Using both, DPPH and FRAP methods, the highest values were obtained for 11-day-old DB, which is in agreement with our earlier study [24].

The mean total phenolic compounds content in drone brood was 25% higher than that of royal jelly and the highest value was obtained for 7-day-old DB which slightly decreased in later stages of larvae development. In the 14-day-old brood, the content of phenolic compounds decreased significantly ($p < 0.05$).

Among the tested samples, royal jelly showed a higher content of flavonoids compared to the average content in brood by 21.89%, however, in the 11-day-old brood the highest content of flavonoids was found. The differences in the content of flavonoids in DB at different stages of development were significant ($p < 0.05$).

3.3.2. Hormonal Activity

Steroid hormones (testosterone and estradiol) in drone brood and royal jelly were analyzed in this study (Table 4).

The conducted research showed that drone brood is a valuable product containing on average 4.42 nmol/100 g of testosterone, which is 6-fold higher than royal jelly. Moreover, the testosterone level increases significantly with the development phase of the drone brood ($p < 0.05$). The 14-day-old DB contains 57% more male sex hormone than 11-day-old brood and 91.8% more than 7-day-old brood.

An opposite relationship was demonstrated by analyzing the level of estradiol in tested bee products. A comparative analysis of drone brood and royal jelly showed that DB at the earlier stages of development is a richer source of estradiol than royal jelly. On average, drone brood has over 76% higher estradiol content compared to royal jelly ($p < 0.05$). As the brood matured, the level of this hormone decreased and on day 14, the concentration was 63% lower compared to day 7 of development.

3.3.3. Enzyme Activity

Acid glycosidases were tested in drone brood for the first time. Since the enzymes required an appropriate pH to maintain catalytic activity, the optimal pH for each enzyme was tested at the beginning. Figure 3 shows the dependence of the activity of selected

glycosidases on pH (in the range of pH 2.5–7.0). The calculated values of pH optimum are shown in Table 5. The highest enzyme activities were observed in the pH range of 4.0–5.0. The same pH was determined as optimal for all tested enzymes that occurred in DB and RJ, excluding β -glucosidase activity where the most acidic pH optimum was found in RJ compared to DB (Figure 3).

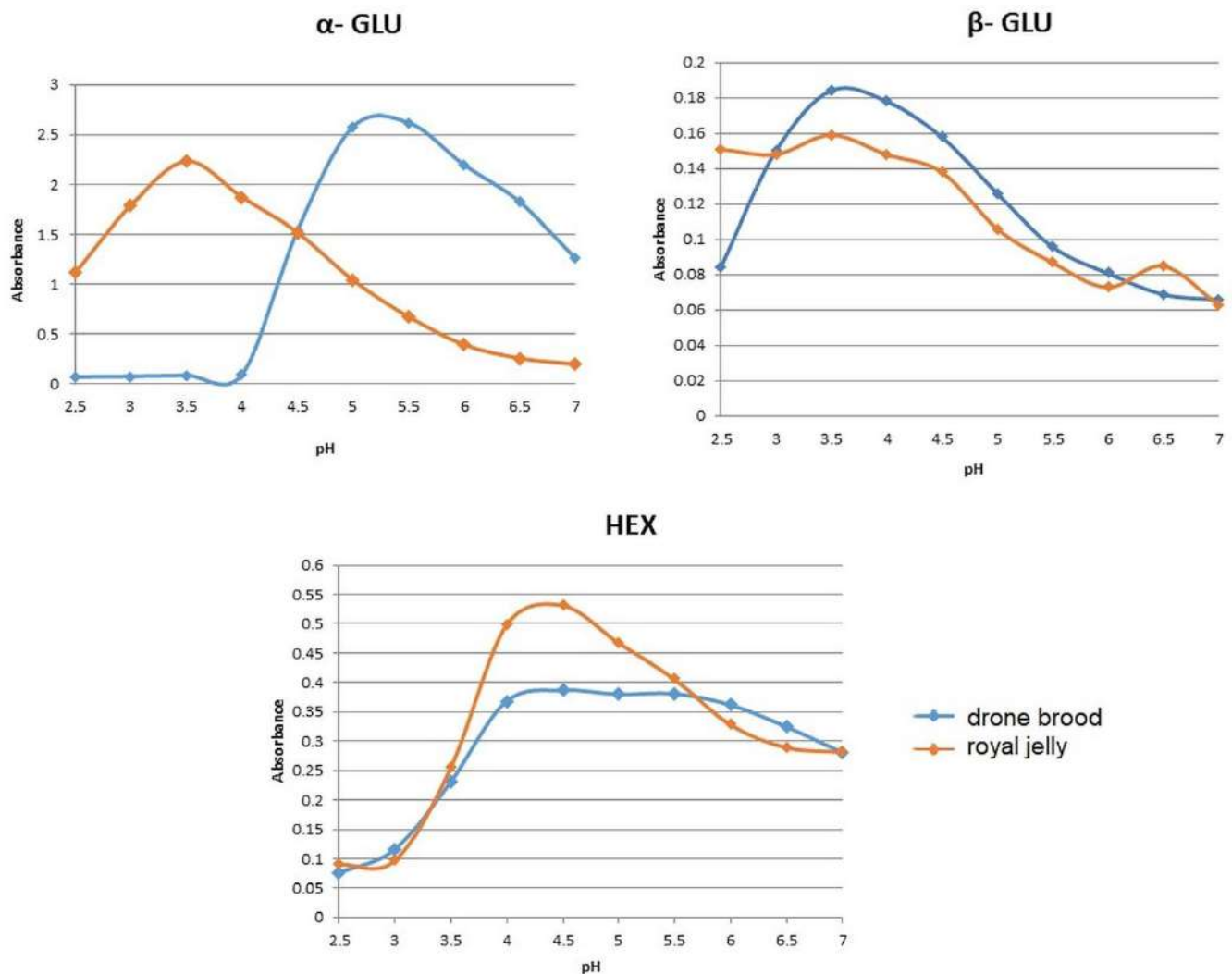


Figure 3. The comparison of optimum pH for selected glycosidases from drone brood and royal jelly.

Using determined optimal pH conditions, the specific activities of the tested glycosidases, as well as acid and alkaline phosphatases, were compared using the spectrophotometric method (Table 5).

Based on the tests of enzymatic activity of DB and RJ, it was found that both bee products exhibit the activity of all tested enzymes. However, royal jelly showed significantly lower enzymatic activity compared to the drone brood ($p < 0.05$). In terms of decreasing activity, the glycosidases in DB can be arranged in the following order: HEX > α -GLU > α -MAN > β -GLU > β -GAL > acid phosphatase, whereas for other studied enzymes only trace activity was found. Moreover, the peak of activity for 11-day-old brood was observed for all tested enzymes. In the case of RJ, the enzyme activity decreased in a completely different order: β -GLU > acid phosphatase > β -MAN. For HEX, the most active acid glycosidase in DB, the activity recorded in RJ was by 20-times lower. The same relationship for α -MAN was observed but when younger brood was taken for comparison only. RJ was more abundant in alkaline phosphatase, whereas DB exhibited higher activity of acid phosphatase. Moreover, for the activity of α -amylase, an enzyme that breaks down

polysaccharides into simple sugars, only trace activity was demonstrated in RJ, whereas DB showed a strong activity of this enzyme. The highest amylase activity in the 7-day-old DB was checked which decreased during the development progress.

Table 5. Specific enzyme activity in drone brood and royal jelly measured in optimal pH conditions.

Enzyme	pH Optimum	Drone Brood [U/100 g WW]			Mean (7–14-day-old)	Royal Jelly [U/100 g WW] (n = 3)
		7-day-old (n = 3)	11-day-old (n = 3)	14-day-old (n = 3)		
α -GLU	5.0 DB; 3.5 RJ	47.0–47.8 (47.4) ^c	82.2–84.1 (82.9) ^d	19.5–22.0 (20.7) ^b	50.3 ^B	0.6–0.9 (0.7) ^{aA}
β -GLU	4.0 DB; RJ	2.2–3.9 (3.0) ^{ab}	3.9–5.6 (4.7) ^b	0.00–0.8 (1.0) ^a	2.90 ^A	6.9–7.7 (7.4) ^{cB}
α -GAL	4.0 DB; RJ	0.4–1.4 (0.9) ^{ab}	0.8–2.3 (1.2) ^c	0.3–1.7 (1.1) ^{bc}	0.99 ^B	0.5–0.7 (0.6) ^{aA}
β -GAL	4.0 DB; RJ	1.6–2.4 (2.0) ^b	2.7–4.2 (3.3) ^d	1.2–4.1 (2.9) ^{cd}	2.73 ^B	0.6–0.7 (0.6) ^{aA}
α -MAN	5.0 DB; RJ	21.0–22.8 (21.9) ^c	33.0–34.4 (33.9) ^d	2.0–4.6 (3.4) ^b	19.71 ^B	1.2–1.5 (1.3) ^{aA}
β -MAN	5.0 DB; RJ	0.6–1.0 (0.8) ^a	1.0–2.7 (1.8) ^b	0.1–1.3 (0.7) ^a	0.99 ^A	0.7–0.9 (0.8) ^{aA}
HEX	5.0 DB; RJ	59.0–68.3 (64.1) ^b	156.8–157.7 (157.1) ^d	80.8–88.0 (81.8) ^c	101.0 ^B	0.9–8.1 (4.5) ^{aA}
Alkaline phosphatase	10.5 DB; RJ	0.1–1.2 (0.5) ^a	0.1–1.4 (0.7) ^a	0.1–1.0 (0.5) ^a	0.56 ^A	0.8–1.5 (1.1) ^{bB}
Acid phosphatase	5.0 DB; RJ	1.6–3.4 (2.4) ^b	3.7–5.5 (4.5) ^c	1.0–3.7 (2.1) ^{ab}	3.0 ^B	1.5–1.6 (1.6) ^{aA}
α -amylase (U/g)	5.0 DB; RJ	14.0–17.60 (16.4) ^d	13.1–14.5 (13.8) ^c	5.2–11.9 (8.15) ^b	12.78 ^B	0.46–0.64 (0.56) ^{aA}

^{a,b,c,d}—results marked with a different superscript in the rows are significantly different (Tukey’s test, $p < 0.05$). ^{A,B}—results marked with a different superscript between royal jelly and mean value for drone brood are significantly different (Tukey’s test, $p < 0.05$).

Taking into account different origins of DB (tissue) and RJ (secretion) enzymes their thermal stability was tested at 60 °C, during 120 min. As the catalytic activity of an enzyme is influenced by pH, the effect of high temperature on selected enzymes activity was tested in two various pH environments (4.0 and 6.0) (Figure 4).

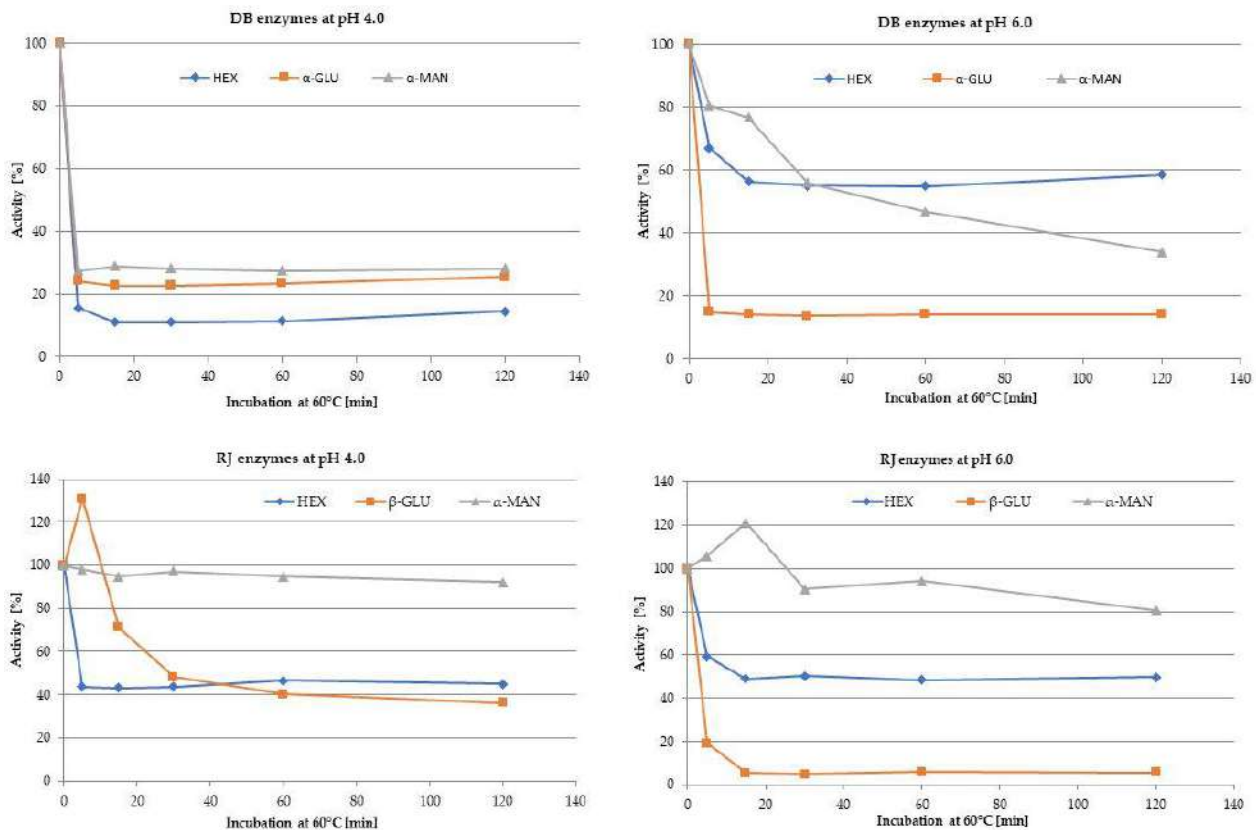


Figure 4. Thermostability of selected enzymes of drone brood (hexosaminidase, α -glucosidase, α -mannosidase, acid phosphatase) and royal jelly (hexosaminidase, β -glucosidase, α -mannosidase, acid phosphatase) at pH 4.0 or 6.0 during 120 min incubation at 60 °C.

The analysis showed that the enzymes of the drone brood are more stable at pH 6.0 which is the natural pH of DB homogenate. In an acidic environment, they were losing their activity quickly. For RJ enzymes, the stabilizing effect of less acidic pH on thermal inhibition of tested enzyme activity was not observed, on the contrary, the activity of β -glucosidase was completely destroyed at this pH.

3.4. High Performance Thin Layer Chromatography Analysis

3.4.1. Polyphenolic Profile

The chromatogram of the separation of phenolic acids and flavonoids in the crude drone brood homogenates and royal jelly is shown in Figure 5. The bands create unique fingerprints of drone brood and royal jelly and allow for visual differentiation, forming a system similar to common barcodes used for marking consumer goods.

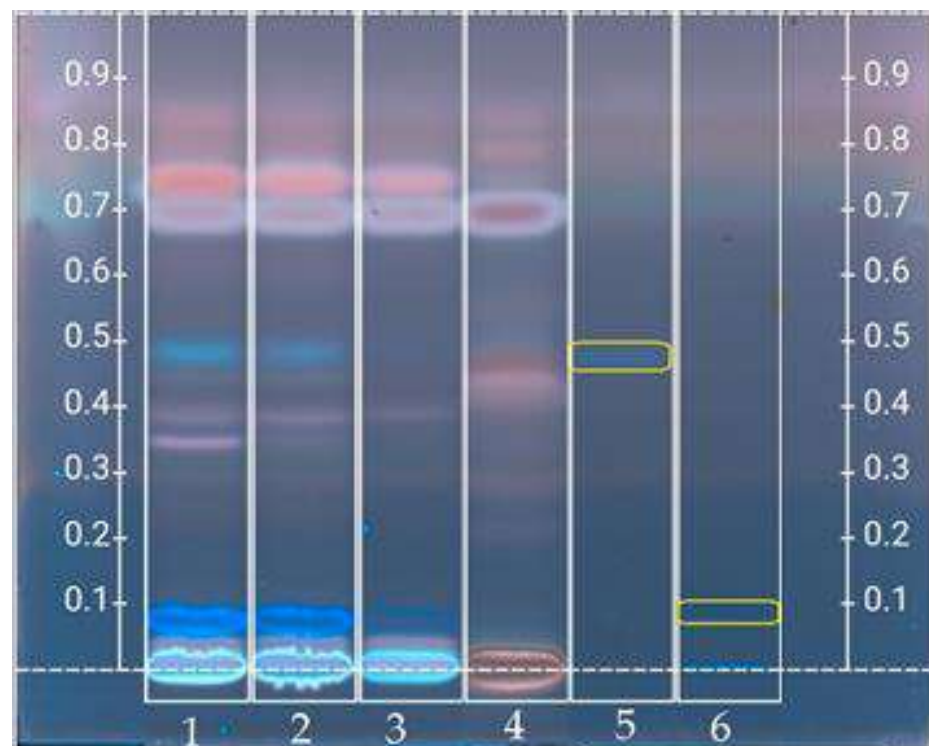


Figure 5. HPTLC chromatogram of phenolic compounds at 365 nm (after p-anisaldehyde derivatization) in crude drone brood and royal jelly, where (1) 7-day-old; (2) 11-day-old; (3) 14-day-old; (4) royal jelly; (5) ferulic acid; (6) ellagic acid. (Drone brood and royal jelly extracts showing the best results in previous analyses were only shown).

The HPTLC phenolic profile chromatogram (Figure 5) is characterized by differentiation in terms of the location of the bands and their color intensity, which proves qualitative and quantitative differences in the analyzed samples of drone brood and royal jelly. The identification of the phenolic compounds was based on the Rf values (distance) and color of the standards used. The obtained profiles contain mainly blue bands (characteristic for caffeic, p-coumaric, and ferulic acid) [25]. Blue bands dominate in the DB homogenate chromatogram, which proves the presence of ferulic acid (Rf = 0.48) and ellagic acid (Rf = 0.08) in the tested material. Additionally, some white stained bands are visible in the DB samples (at Rf = 0.39, 0.34 for a 7-day DB). In contrast, the RJ sample shows numerous bands of slightly pink color. The group of bands with high Rf values (above 0.65) stained pink or purple corresponds most likely to steroid compounds.

HPTLC chromatograms show similarities and differences in the composition of the identified compounds between the drone brood and royal jelly, as well as within the

different development stages of the drone brood. Based on the intensity of the band, it should be concluded that in 14-day-old male brood much smaller amounts of ferulic acid were found, while ellagic acid was present in trace amounts. Moreover, no bands were found in the royal jelly to indicate the presence of ferulic and ellagic acids.

3.4.2. Sugars

During the HPTLC separation of reducing sugars, after derivatization and heating the plate to 110 °C for 10 min, gray-green bands are formed on an almost colorless background, and some of them fluoresce at 365 nm, which is crucial for the construction of characteristic fingerprints [26].

Figure 6 shows the sugar profile of drone brood and royal jelly. The reference standards used were glucose ($R_f = 0.34$), fructose ($R_f = 0.24$), sucrose ($R_f = 0.30$), melezitose ($R_f = 0.17$), trehalose ($R_f = 0.21$), turanose ($R_f = 0.26$), maltose ($R_f = 0.22$). The sugar bands in the drone brood were more intense and more pronounced, which proves the higher content of the discussed compounds. Based on the intensity of the bands, it was found that drone brood is a richer source of glucose and fructose compared to royal jelly. Moreover, the intensity of the bands indicated that the content of the analyzed reducing sugars in the brood varies regardless of the stage of development.

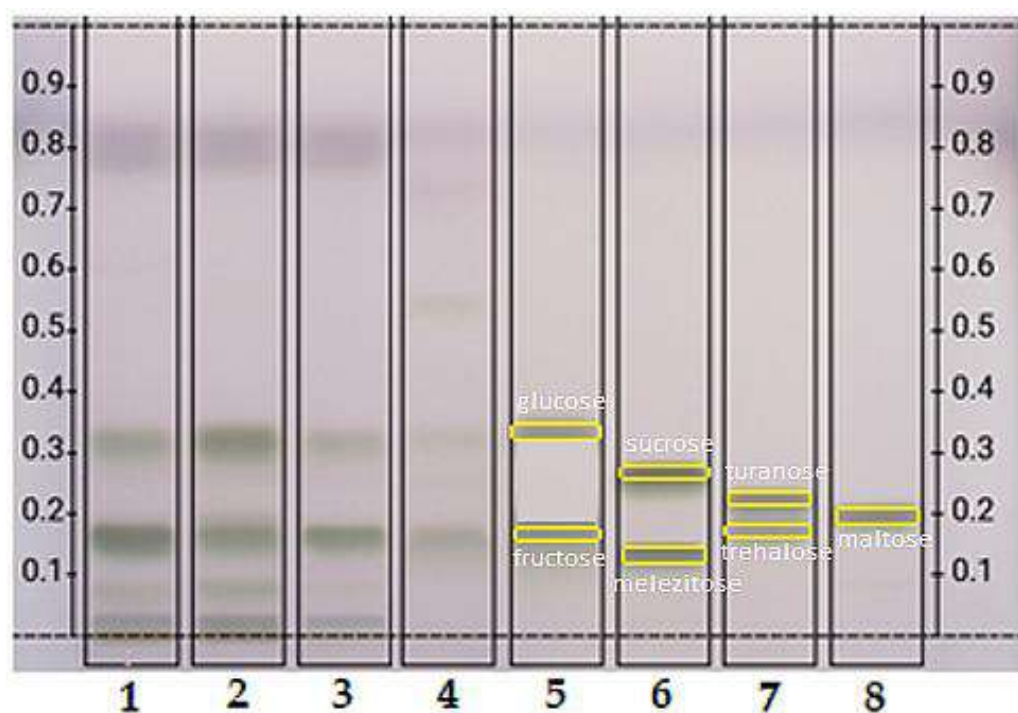


Figure 6. HPTLC chromatogram of sugars compounds at RT white in crude drone brood and royal jelly, where (1) 7-day-old; (2) 11-day-old; (3) 14-day-old; (4) royal jelly; (5) glucose, fructose; (6) sucrose, melezitose; (7) trehalose, turanose; (8) maltose. (Drone brood and royal jelly extracts showing the best results in previous analyses were only shown).

Royal jelly contains fewer reducing sugars analyzed, as demonstrated by the weak intensity of the glucose and fructose bands. Moreover, the presence of trehalose in the brood and royal jelly cannot be eliminated, because its R_f is very similar to the fructose R_f , so that the bands may overlap, which makes it difficult to accurately identify the sugars in the bee products tested. However, it should be noted that the royal jelly chromatogram shows two additional bands of weak intensity. The first at the height of turanose ($R_f = 0.26$) and the second undefined at $R_f = 0.53$. Similarly, additional bands for DB samples which did not occur in RJ profile were noted at $R_f = 0.08$ and 0.01 . These compounds have not been identified, which indicates the need for further, extensive research.

3.4.3. Amino Acids

The chromatographic results of amino acids fingerprints determination in drone brood and royal jelly in different stages of development and royal jelly are presented in Figure 7.

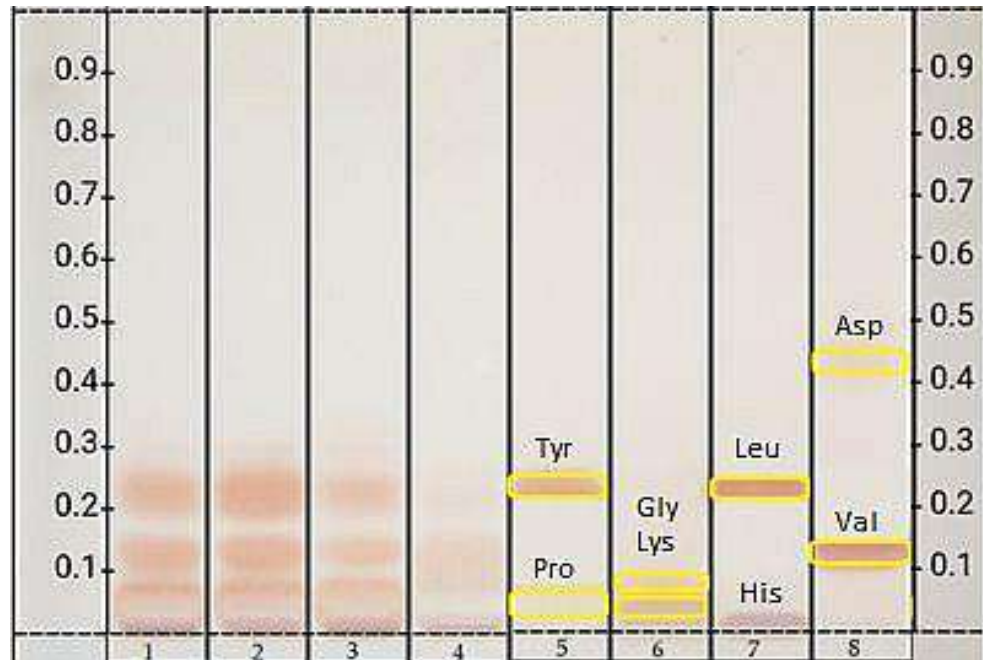


Figure 7. HPTLC chromatogram of amino acids compounds at RT white in crude drone brood and royal jelly, where (1) 7-day-old; (2) 11-day-old; (3) 14-day-old; (4) royal jelly; (5) proline, tyrosine; (6) glycine, lysine; (7) histidine, leucine; (8) aspartic acid, valine. (Drone brood and royal jelly extracts showing the best results in previous analyses were only shown).

The HPTLC chromatograms indicate similarities and differences in the composition of the identified compounds between drone brood and royal jelly. The bands for drone brood are dominated by yellowish and orange color, with major bands at Rf in the range of 0.01–0.30. The chromatogram bands for royal jelly are much less intense in color compared to drone brood, which indicates a lower content of amino acids. However, the royal jelly presents notable bands at Rf in the same range as in drone brood. Proline (Rf = 0.04) which forms light yellow to white band, was present in the RJ. The band is also visible in the drone brood, however, due to the overlapping of other amino acids with a similar Rf (glycine Rf = 0.07; lysine Rf = 0.08) the proline band was poorly visible. Moreover, a band with an Rf = 0.29, which is assigned to tyrosine and/or leucine, as well as valine (Rf = 0.15), was also identified in the brood. A poorly visible valine band was also found in royal jelly. The histidine band (left on the starting line) was present in all samples in a higher amount in DB than RJ.

4. Discussion

For the first time, drone brood and royal jelly that originated from the same apiaries were compared in terms of their chemical composition. Moreover, the changes in chemical composition of drone brood during larvae development were tested. As DB and RJ are assumed to have a similar chemical composition, recent cases of adulteration of RJ with the addition of brood were detected. This is because DB is an easy to obtain bee product compared to RJ only [27]. Obtaining drone brood on an industrial scale is easier and more beneficial than royal jelly. Drone larvae can be extracted easily from the combs before capping even with the use of a stream of water. Moreover, up to 1.3 kg of drone brood can be obtained annually on average from one bee family without consequences for its condition. In opposite, royal jelly can be obtained in larger quantities only in specialized apiaries, where it is produced using royal jelly-producing chamber [25].

The comparison between RJ and DB was started from basic physicochemical parameters analysis. All tested parameters were found to be stable in drone brood regardless of the stage of larvae development. DB contained more water than royal jelly. Our finding of the moisture content for drone brood was similar to earlier reported data [28–30]. Royal jelly was more acidic but exhibited lower total acidity compared to DB. Obtained data agreed with the values reported by Krell [31], Ramadan and Al-Ghamdi [8], and Nabas et al. [32]. The observed differences in pH and acidity values could be a useful tool in the detection of RJ adulteration with drone brood.

Both tested bee products were found as valuable sources of macro- and microelements, however, in most cases, the royal jelly was more abundant in minerals. Any significant differences resulting from botanical and geographic origins of samples were observed. This fact emphasizes the homeostatic regulation of the concentrations of trace and mineral elements produced in the endocrine glands of bees [3]. In turn, in the course of larvae development great fluctuations in the content of bioelements were observed. Higher phosphorus but a much lower calcium content was found in DB than in RJ. Among microelements, iron and manganese prevailed in DB, whereas higher zinc level was found in RJ. The results obtained in this work are in line with other authors' studies. Stocker et al. [33] checked the similar mineral composition of royal jelly. It showed that the main element was potassium (246.6–312 mg/100 g), phosphorus (194–235 mg/100 g), calcium (113–145 mg/100 g) and magnesium (26.4–31.2 mg/100 g). Similar results were reported for royal jelly by Bengu et al. [34]. Moreover, the results obtained for the drone brood are in agreement with available literature. Prokhoda et al. [35] showed a similar content of magnesium, manganese, and copper in the analyzed DB samples.

Similar protein content was found in drone brood and royal jelly. Moreover, the protein level was not dependent on the developmental stage of DB. On the opposite, when only soluble protein fraction was analyzed, the higher value for RJ and the increase of protein content in the course of larvae development were found. The obtained DB total proteins content was consistent with the literature data [35,36]. The value found for RJ samples in this study was within the range reported by several authors [8,32,36,37]. The water-soluble proteins accounted for only 25–35% of the total protein content in the drone brood and 50% in the royal jelly. This is because the Dumas method measures the protein content indirectly based on its nitrogen content which includes other biomolecules containing nitrogen also, e.g., amino acids, nucleic acids, and other nitrogenous compounds.

The protein composition of the DB was more diversified than RJ. The proteome of the drone brood was related to the stage of development and was completely different from the royal jelly protein profile, especially in the range of lower-mass proteins. For royal jelly six major protein fractions with a mass range of 50–90 kDa were detected, which corresponds to MRJP proteins. The most intense band has approx. 57 kDa, which corresponds to MRJP-1 [38]. The observed differences seem to be obvious considering the origin of both samples: DB as a tissue sample contains other proteins that additionally differentiate as the larva develops, while RJ is a bee secretion with a stable composition.

Among proteins detected in tested bee products, the most important are enzymes, including lysosomal glycosidases which belong to glycoproteins [4,5]. Most of these enzymes, characterized by acidic pH optimum, are common in various tissues of animals and can be secreted outside the cell into body fluids [4]. Thus, their occurrence has been expected in both drone larvae and royal jelly extracts. However, different enzymatic profiles for both materials were found. Drone brood showed high hexosaminidase activity (22 times higher than RJ) which is typical for tissue homogenates [39,40]. The most active were α -glucosidase, α -mannosidase and β -galactosidase specific for tissue extracts. Whereas, for royal jelly β -glucosidase and β -mannosidase were found as the most active. Testing the dependence of the activity of tested glycosidases on pH (in the range 2.5–7.0), it was shown that they exhibited the pH optimum in the range of 4.0–5.0 the same for DB and RJ, excluding β -glucosidase from RJ. The activity of these enzymes was studied in DB for the first time and the results are in line with those obtained for RJ [4]. When the temperature

increased above 40 °C, gradual denaturation and loss of catalytic abilities were noted. However, the pH environment affected the thermal resistance of DB enzymes only.

Droba et al. [4,5] investigated the activity of acid glycosidases in royal jelly and queen bee larvae. They showed many times greater enzyme activity of queen bee larvae than royal jelly. Moreover, the activity of enzymes in individual samples of royal jelly was varied. Amylolytic and glycolytic enzymes can enrich the environment with easily digestible nutrients and other valuable ingredients. On the other hand, lysosomal glycosidases may favor the processes taking place in the royal jelly modifying the composition of the glycan component of glycoconjugates [5]. Diastase is one of the major enzymes found in honey. Diastase activity is well used as a criterion to assess the quality of the product [41]. However, to date, no studies have been found showing α -amylase activity in brood or royal jelly. The analysis showed high α -amylase activity in drone brood, while in royal jelly this enzyme was present in trace amounts.

Both tested bee products exhibited antioxidant properties, however, DB was more active than RJ, regardless of the assay. The antiradical properties of drone brood were changing during larvae development. Thus, the highest values obtained by DPPH and FRAP methods for 11-day-old DB in this study are in line with our earlier report [22]. Drone brood antioxidants are represented by polyphenolic compounds, vitamins C and E, enzymes, unsaturated fatty acids in free and bound forms, including unique decenoic acids, substances having sulfhydryl groups, flavonoid, and other phenolic compounds [42]. Silici [13] examined the bioactivity of apilarnil (lyophilized drone brood) and showed the total phenolic content at the level 834.05 mg GAE/100 g which is comparable with the results of this work when calculated them to dry mass.

Direct visual comparison of reducing sugar bands obtained by HPTLC analysis for brood and royal jelly with the standards entered, provided new reliable semi-quantitative information. It should be emphasized that the TLC method is most suitable for detecting many carbohydrates present in food products, mainly in fruit and vegetable juices [43]. The obtained data are in line with those presented by Bogdanov [12], who proved that drone brood contains two times more glucose than royal jelly. Similarly, Margaoan et al. [44] checked the carbohydrate content in royal jelly and drone brood using the HPLC-IR method and showed a slightly higher content of glucose (1%) than fructose in royal jelly. The same correlation was observed for the drone brood, but the glucose content was several hundred times higher than that of fructose [44]. Moreover, in royal jelly, he showed sucrose, which was not found in the brood. Drone brood was a richer source of maltose and trehalose compared to royal jelly [44].

This study presented also a new idea to test the amino acid profile in bee products using HPTLC analysis. The chromatogram bands for royal jelly amino acids were much less intense compared to drone brood, which indicates a lower content of amino acids. However, the royal jelly presents notable bands at R_f in the same range as in drone brood, including proline, glycine, lysine, tyrosine, and leucine, as well as valine, which was the most intense band in the 11-day-old brood. Obtained data are in agreement with other author findings where the greatest amounts of glutamic acid, leucine and aspartic acid, proline, lysine, valine, and alanine which make up about 60% of all amino acids of drone brood and royal jelly [27,44]. Amino acids that could be markers of the quality of royal jelly and drone brood are mainly glutamine—found only in royal jelly and threonine present in much greater amounts in drone brood. A similar relationship was observed for leucine, histidine, and tyrosine [44]. In turn, drone brood has the highest content of proline from all the analyzed bee products and for this reason, this bee product is very important as a food supplement or an ingredient in other types of natural supplements [45].

Based on the analysis of the color intensity and the number of bands on HPTLC chromatograms, it should be concluded that the richest source of phenolic compounds is the 7-day-old drone brood, and the weakest is the 14-day-old one. However, the phenolic profiles obtained for drone brood and royal jelly were completely different, ferulic and ellagic acids were not found in royal jelly. Such observation was done for the first time.

According to earlier reports, some flavonoids were expected [24,34,46] and tested (naringenin, apigenin, chrysin, sakuranetin) there are certain flavonoids: flavanones (hesperetin, naringenin), flavones (apigenin derivatives), and isoflavonoids (genistein, formononetin, coumestrol), as well as ferulic acid present in royal jelly. However, there are no polyphenol profiles available for the drone brood. Differences in phenolic compound profiles in the future could be used to determine adulteration of royal jelly with drone brood in order to improve quality. Due to the limited availability of reference substances and the unknown topic, further analyses are needed to fully identify the unknown compounds.

In some population cultures, honeybee larvae are used to treat male infertility [45,47]. Previously, it was mistakenly assumed that the use of larvae for infertility treatment was due to the high protein content in the larvae, but subsequent chemical analysis revealed the presence of sex hormones in drone larvae [48]. The obtained results of the hormonal activity of testosterone and estradiol in drone brood (in the early stage of development) and royal jelly are comparable with the Bogdanov [12], who found that the crude brood homogenate contains 0.31 nmol/100 g of testosterone, 51.3 nmol/100 g of progesterone, 410.65 nmol/100 g of prolactin, and 677.6 nmol/100 g of estradiol. Moreover, crude royal jelly contains 0.20 nmol/100 g of testosterone and 52.0 nmol/100 g of estradiol [12]. It should also be stated that the early stage of drone brood is more active in testosterone and estradiol than RJ. As the stage of development changes, the activity of testosterone increases and estradiol decreases. Since royal jelly showed much lower hormonal activity—both testosterone and estradiol—testing the hormonal activity may be a checkpoint for the adulteration of royal jelly with drone brood.

5. Conclusions

Drone brood, considered the male equivalent of royal jelly, is a new, little known and rarely tested bee product. The chemical composition related to the drone larvae developmental stage has not been studied in detail yet. It was found that the content of bioactive compounds changed during larvae development and the highest level of the majority of tested parameters for 11-day-old brood was observed. However, the change in the content of bioactive compounds caused by developmental changes, drone brood, compared to royal jelly, shows better physicochemical properties and greater biological activity, mainly hormonal, enzymatic, and antioxidant.

Due to the high physicochemical similarity, royal jelly may be admixed with drone brood, which is not officially marketed as a food product or food additive. Thus, searching for effective markers to differentiate adulterated royal jelly seems to be an urgent problem. As the most promising indicators of royal jelly purity, α -amylase activity together with other glycosidases (hexosaminidase, α -glucosidase, and α -mannosidase) were selected.

Drone brood as an easy to obtain beekeeping product, sometimes considered as waste, could be applied as a direct functional food thanks to the greater abundance of protein, amino acid, steroids and polyphenols compared to royal jelly.

Author Contributions: Conceptualization, M.D. and E.S.; methodology, E.S., A.B. and G.Z.; software, M.M.; validation, E.S. and G.Z.; formal analysis, M.D. and M.M.; investigation, E.S., A.B., G.Z. and M.M.; resources, M.D.; data curation, E.S.; writing—original draft preparation, E.S.; writing—review and editing, M.D.; visualization, M.M.; supervision, M.D.; project administration, E.S.; funding acquisition, M.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Regional Excellence Initiative (RID) in the years 2019–2022, project number 026/RID/2018/19.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Acknowledgments: We would like to thank a local beekeepers Elżbieta Flis, Bogdan Rogala and Jerzy Bańkowski who engaged in the preparation of bee families to obtain drone brood and royal jelly for research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Shoinbayeva, K.B.; Omirzak, T.; Bigara, T.; Abubakirova, A.; Dauylbay, A. Biologically active preparation and reproductive function of stud rams. *Asian J. Pharm.* **2017**, *11*, 184–191. [CrossRef]
- Sidor, E.; Dżugan, M. Drone brood homogenate as a natural remedy for treating health care problem—A scientific and practical approach. *Molecules* **2020**, *25*, 5699. [CrossRef]
- Collazo, N.; Carpena, M.; Nuñez-Estevez, B.; Otero, P.; Simal-Gandara, J.; Prieto, M.A. Health Promoting Properties of Bee Royal Jelly: Food of the Queens. *Nutrients* **2021**, *13*, 543. [CrossRef]
- Droba, B.; Droba, M.; Sibirnaja, L. Aktywność kwaśnych glikozydaz w mleczku pszczelim pozyskiwanym z mateczników na różnych etapach rozwoju larwy. *Zesz. Probl. Postęp. Nauk Rol.* **2016**, *584*, 13–21. (In Polish)
- Droba, B.; Droba, M.; Sibirnaja, L. Enzymy hydrolityczne z grupy kwaśnych glikozydaz występujące w mleczku pszczelim. In *Właściwości Produktów i Surowców Żywnościowych, Wybrane Zagadnienia*; PTTŻ: Kraków, Poland, 2014; pp. 125–135. (In Polish)
- Wilde, J. *Encyklopedia Pszczelarska*; PWRiL: Warszawa, Poland, 2013; pp. 1–453. (In Polish)
- Martinello, M.; Mutinelli, F. Antioxidant activity in bee products: A review. *Antioxidants* **2021**, *10*, 71. [CrossRef] [PubMed]
- Ramadan, M.F.; Al-Ghamdi, A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *J. Funct. Foods* **2012**, *4*, 39–52. [CrossRef]
- Wang, Y.; Ma, L.; Zhang, W.; Cui, X.; Wang, H.; Xu, B. Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **2016**, *47*, 48–56. [CrossRef]
- Bałkańska, R. Sugar Composition of Royal Jelly Adulterated with Drone Brood and Bee Honey. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2018**, *7*, 1876–1881. [CrossRef]
- Wang, Z.; Ren, P.; Wu, Y.; He, Q. Recent advances in analytical techniques for the detection of adulteration and authenticity of bee products—A review. *Food Addit. Contam. Part A* **2021**, *38*, 533–549. [CrossRef]
- Bogdanov, S. Royal Jelly and Bee Brood: Harvest, Composition, Quality. In *The Royal Jelly Book; Bee Product Science*; Muethlethurnen, Switzerland, 2012; Available online: www.bee-hexagon.net (accessed on 10 July 2021).
- Silici, S. Chemical Content and Bioactive Properties of Drone Larvae (Apilarnil). *Mellifera* **2019**, *19*, 14–22.
- Sawczuk, R.; Karpińska, J.; Miłyk, W. What do we need to know about drone brood homogenate and what is known. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *245*, 111581. [CrossRef]
- Thompson, M.; Owen, L.; Wilkinson, K.; Wood, R.; Damant, A. A comparison of the Kjeldahl and Dumas methods for the determination of protein in foods, using data from a proficiency testing scheme. *Analyst* **2002**, *127*, 1666–1668. [CrossRef] [PubMed]
- Latimer, G.W. *Official Methods of Analysis of AOAC International*; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 2016.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *15*, 680–685. [CrossRef] [PubMed]
- Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D.; Ehrhardt, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **1988**, *9*, 255–262. [CrossRef]
- Estradiol; Elisa Test Kit. Abbexa, UK. Available online: <https://www.abbexa.com/estradiol-elisa-kit> (accessed on 13 September 2021).
- Testosterone; Elisa Test Kit. Abbexa, UK. Available online: <https://www.abbexa.com/testosterone-t-elisa-kit> (accessed on 13 September 2021).
- Dżugan, M.; Tomczyk, M.; Sowa, P.; Grabek-Lejko, D. Antioxidant Activity as Biomarker of Honey Variety. *Molecules* **2018**, *23*, 2069. [CrossRef]
- Biju, J.; Reddy, V.; Sulaiman, C.T. Total Phenolics and Flavonoids in Selected Justicia Species. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2013**, *2*, 51–52.
- Barrett, A.; Heath, M. Lysosomal enzymes. In *Lysosomes: A Laboratory Handbook*; Dingle, J., Ed.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press: Amsterdam, The Netherlands, 1977; pp. 19–30.
- Sidor, E.; Miłek, M.; Tomczyk, M.; Dżugan, M. Antioxidant activity of frozen and freeze-dried drone brood homogenate regarding the stage of larval development. *Antioxidants* **2021**, *10*, 639. [CrossRef]
- Bertrams, J.; Kunz, N.; Müller, M.; Kammerer, D.; Stintzing, F.C. Phenolic compounds as marker compounds for botanical origin determination of German propolis samples based on TLC and TLC-MS. *J. Appl. Bot. Food Qual.* **2013**, *86*, 143–153. [CrossRef]
- Glinka, M.; Łukajtis, R.; Nowak, P.; Kamiński, M. Liquid chromatography techniques, used in technical analysis of hydrolysis processes, of lignocellulosic biomass. *Camera Sep.* **2017**, *9*, 92–105.
- Bałkańska, R.; Karadjova, I.; Ignatova, M. Comparative analyses of chemical composition of royal jelly and drone brood. *Bulg. Chem. Commun.* **2014**, *46*, 412–416.
- Barnutiu, L.I.; Marghițaș, L.A.; Dezmiorean, D.; Bobiș, O.; Mihai, C.; Pavel, C. Physico-chemical composition of apilarnil (bee drone larvae). *Lucr. Științifice-Seria Zooteh.* **2013**, *59*, 199–202.

29. Wytrychowski, M.; Chenavas, S.; Daniele, G.; Casabianca, H.; Batteau, M.; Guibert, S.; Brion, B. Physicochemical characterisation of French royal jelly: Comparison with commercial royal jellies and royal jellies produced through artificial bee-feeding. *J. Food Compos. Anal.* **2013**, *29*, 126–133. [[CrossRef](#)]
30. Kolayli, S.; Sahin, H.; Can, Z.; Yildiz, O.; Malkoc, M.; Asadov, A. A member of complementary medicinal food: Anatolian royal jellies, their chemical compositions, and antioxidant properties. *J. Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2016**, *21*, NP43–NP48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Krell, R. *Value—Added from Beekeeping*; Bulletin No. 124; FAO Agricultural Services: Rome, Italy, 1996; pp. 409–411.
32. Nabas, Z.; Haddadin, M.S.; Haddadin, J.; Nazer, I.K. Chemical composition of royal jelly and effects of symbiotic with two different locally isolated probiotic strains on antioxidant activities. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2014**, *64*, 171–180. [[CrossRef](#)]
33. Stocker, A.; Schramel, P.; Kettrup, A.; Bengsch, E. Trace and mineral elements in royal jelly and homeostatic effects. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2005**, *19*, 183–189. [[CrossRef](#)]
34. Bengü, A.Ş.; Ayna, A.; Özbolat, S.; Tunç, A.; Aykutoğlu, G. Content and antimicrobial activities of bingol royal jelly. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Derg.* **2020**, *7*, 480–489. [[CrossRef](#)]
35. Prokhoda, A.; Yankina, O.; Kim, N.; Koltun, G.; Skolov, A. Chemical composition of the far eastern homogenate of drone brood. *E3S Web Conf.* **2020**, *203*, 4015. [[CrossRef](#)]
36. Iliesiu, N. A modern preparation of bees “Apilarnil”. *Inf. Reg. Zrzesz. Pszczel. Apipol.* **1988**, *10*, 15–20.
37. Sabatini, A.M.; Caboni, G.; Bogdanov, M.S.; Almeida-Muradian, L. Quality and standardisation of Royal Jelly. *J. ApiProd. ApiMed. Sci.* **2009**, *1*, 16–21. [[CrossRef](#)]
38. Han, B.; Li, C.X.; Zhang, L.; Fang, Y.; Feng, M.; Li, J. Novel Royal Jelly Proteins Identified by Gel-Based and Gel-free Proteomics. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 10346–10355. [[CrossRef](#)]
39. Džugan, M.; Lis, M.; Droba, M.; Niedziółka, J.W. Effect of cadmium injected in ovo on hatching results and the activity of plasma hydrolytic enzymes in newly hatched chicks. *Acta Vet. Hung.* **2011**, *59*, 337–347. [[CrossRef](#)]
40. Džugan, M.; Lis, M. Cadmium-induced changes in hatchability and in the activity of aminotransaminases and selected lysosomal hydrolases in the blood plasma of Muscovy ducklings (*Cairina moschata*). *Acta Vet. Hung.* **2016**, *64*, 239–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Thrasyvoulou, A.T. The use of HMF and diastase as criteria of quality of Greek honey. *J. Apic. Res.* **1986**, *25*, 186–195. [[CrossRef](#)]
42. Mitrofanov, D.V.; Vakhonina, E.A.; Budnikova, N.V. Reducing agents of drone brood products supplemented by royal jelly, propolis and chitosan derivatives. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2021**, *624*, 8–13. [[CrossRef](#)]
43. Farag, S. Separation and Analysis of Some Sugars by Using Thin Layer Chromatography. *J. Sugarbeet Res.* **1978**, *20*, 251–254. [[CrossRef](#)]
44. Margaoan, R.; Marghitas, L.A.; Dezmirean, D.S.; Bobis, O.; Bonta, V.; Catana, C.; Urcan, A.; Muresan, C.I.; Margin, M.G. Comparative Study on Quality Parameters of Royal Jelly, Apilarnil and Queen Bee Larvae Triturate. *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca Anim. Sci. Biotechnol.* **2017**, *74*, 51–58. [[CrossRef](#)]
45. Mbaya, J.S.K. Usages of bee products in folk medicine in Kenya. In *Bee Products: Properties, Application and Apitherapy*; Springer: New York, NY, USA, 1996; p. 98.
46. López-Gutiérrez, N.; Aguilera-Luiz, M.D.M.; Romero-González, R.; Vidal, J.L.M.; Frenich, A.G. Fast analysis of polyphenols in royal jelly products using automated TurboFlow™-liquid chromatography-Orbitrap high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2014**, *973*, 17–28. [[CrossRef](#)]
47. Meda, A.; Lamien, C.E.; Millogo, J. Therapeutic uses of honey and honeybee larvae in central Burkina Faso. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *95*, 103–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Burmistrova, L. Physico-Chemical and Biological Appreciation of Drone Brood. Ph.D. Thesis, Ryazan Medical University, Ryazan, Russia, 1999. (In Russian)

Załącznik nr 1 do uchwały nr 118/07/2022

Rady Naukowej Kolegium Nauk

Przyrodniczych dnia 12 lipca 2022 r.

Rzeszów, dnia 6.04.2023r.

Imię i nazwisko mgr inż. Ewelina Sidor

Jednostka Instytut Technologii Żywności i Żywienia,

Zakład Chemii i Toksykologii Żywności

Promotor prof. dr hab. inż. Małgorzata Dżugan

Promotor pomocniczy dr inż. Monika Tomczyk

OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, oświadczam niniejszym, że wkład mojej pracy naukowej (w ramach dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia), a tym samym pracy pozostałych współautorów w opublikowaniu poniższych artykułów, które zamierzam przedstawić jako własną dysertację doktorską jest następujący:

III. Ewelina Sidor, Michał Miłek, Monika Tomczyk, Małgorzata Dżugan. *Antioxidant Activity of Frozen and Freeze-Dried Drone Brood Homogenate Regarding the Stage of Larval Development*. *Antioxidants* 2021, 10 (5), 639.

- koncepcja badań – zebranie materiału badanego od podkarpackich pszczelarzy, zabezpieczenie materiału do analiz
- dostosowanie metod dotyczących analiz właściwości antyoksydacyjnej metodami DPPH, FRAP, ABTS
- walidacja metody ABTS
- obróbka wszystkich wyników w programie statystycznym, obróbka graficzna uzyskanych wyników
- opis wyników i dyskusja z innymi pracami dostępnymi w formie elektronicznej.
- przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu
- obowiązki autora korespondencyjnego - administrowanie postępów podczas publikacji artykułu i kontakt z Edytorem.

.....Ewelina Sidor.....

Podpis

Oświadczenia współautorów

1. **dr inż. Michał Miłek**

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Ewelinę Sidor udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- walidacja techniki HPTLC do profilowania związków polifenolowych w próbkach biologicznych i wykonanie analizy HPTLC profili polifenolowych próbek czerwii
- wstępna ocena i edycja manuskryptu



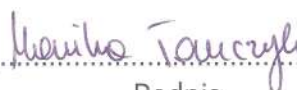
.....
Podpis

2. **dr inż. Monika Tomczyk**

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Ewelinę Sidor udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- udział w tworzeniu pierwszej wersji artykułu
- korekta językowa manuskryptu przed wysłaniem do czasopisma



.....
Podpis

3. prof. dr hab. inż. Małgorzata Dżugan
Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Ewelinę Sidor udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- koncepcja badań – analiza stanu wiedzy w dostępnej literaturze
- wykonanie analiz zawartości flawonoidów
- interpretacja i dyskusja wyników, ostateczna krekta manuskryptu
- pozyskanie finansowania na opublikowanie artykułu



.....
Podpis



Article

Antioxidant Activity of Frozen and Freeze-Dried Drone Brood Homogenate Regarding the Stage of Larval Development

Ewelina Sidor ^{*}, Michał Miłek , Monika Tomczyk and Małgorzata Dżugan

Department of Chemistry and Food Toxicology, Institute of Food Technology and Nutrition, University of Rzeszów, Ćwiklińskiej 1a St., 35-601 Rzeszów, Poland; mmilek@ur.edu.pl (M.M.); mwesolowska@ur.edu.pl (M.T.); mdzugan@ur.edu.pl (M.D.)

* Correspondence: ewelina.sidor@poczta.onet.pl

Abstract: Drone brood is a little-known and poorly studied bee product used and valued in the treatment of many diseases, including male infertility and women's menopausal disorders. The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity of drone brood depending on the stage of larval development and the method of preservation. Aqueous and ethanolic homogenate extracts of drone brood were assayed for antioxidant activity (with the DPPH, FRAP, and ABTS methods), polyphenol, and flavonoid content. The extracts' polyphenolic profiles were compared by the HPTLC method. Drone brood has been shown to be more active in the earlier stages of development (between days 7–11), with a decline in antioxidant activity in the later period (by the 14th day). The freeze-drying process did not cause significant changes in the antioxidant activity of brood preparations converted to dry mass. Based on the higher activity of the aqueous compared to 70% ethanolic extracts, it was shown that the dominant fraction of brood consisted of hydrophilic antioxidants. The results obtained with different methods were highly correlated, excluding those from the ABTS assay. The HPTLC method showed that the polyphenol fraction of drone brood homogenate consisted mainly of phenolic acids and flavonoids. It was shown that drone brood has valuable antioxidant properties that can be compared with royal jelly.

Keywords: drone brood; antioxidant activity; HPTLC; polyphenols; the stage of development



Citation: Sidor, E.; Miłek, M.; Tomczyk, M.; Dżugan, M. Antioxidant Activity of Frozen and Freeze-Dried Drone Brood Homogenate Regarding the Stage of Larval Development. *Antioxidants* **2021**, *10*, 639. <https://doi.org/10.3390/antiox10050639>

Academic Editor: Miguel Vilas-Boas

Received: 24 March 2021

Accepted: 20 April 2021

Published: 22 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Drone brood homogenate, less commonly called drone milk, is a little-known bee product that is often disregarded in articles relating to beekeeping products [1–3] or marginalized with a brief mention [4]. This bee product is obtained from drone larvae collected from the bee family in the spring or early summer, according to the authors of [5,6]. Although the main role of drones is to participate in the mating flight during which the queen is inseminated, a certain percentage of drones (5–10% of the adult bee colony population) is present in the hive throughout the beekeeping season [6]. Raw drone brood homogenate obtained by mechanical homogenization of drone larvae is a milky substance with a creamy consistency, ranging in color from white or yellow to green [5]. It is one of the bee products not widely known in Europe (except Romania and Russia) but recognized and frequently used as a natural medicine in some countries in the world, such as China, Zambia, Senegal, and Ecuador [6].

Due to its high levels of protein, vitamins, and hormones, drone brood is a natural remedy for men's fertility problems, androgen deficiency during menopause in women, and prophylactic measures against conditions associated with osteoporosis. Additionally, it is recommended against nervous and mental diseases and thyroid disorders, has hepatoprotective and anti-atherosclerotic properties, and stimulates the immune system [5–7].

To obtain drone milk, male larvae must be taken on the tenth day after eggs have been laid, or on the seventh day in the larval stage. At this time, a drone larva weighs approximately 250–300 mg and contains all of the necessary substances and elements in

high concentrations [6]. However, data on the most favorable age for larvae are inconclusive, and other authors have suggested using larvae in the later stages, i.e., 9–11 days old [8]. Native homogenate of drone brood obtained from drone cells is unstable during storage and requires additional stabilization to maintain the biological activity of its substances. Different methods are used to stabilize the biological activity of drone homogenate preparations, for example, mixing with honey, freezing, or adsorbing on lactose, but the most effective method is lyophilization, which allows one to preserve the active biological substances in drone brood for a long time [9]. Nowadays, the purest and most popular form of drone brood is the white-yellow powder obtained by freeze-drying fresh drone brood; it is available on the market under the name Apilarnil [6].

The chemical composition of drone brood homogenate is very diverse; it contains proteins (10–20%), carbohydrates (up to 5.0%), fats (5.0–6.3%), amino acids (11.4%), enzymes, hormones, and vitamins [5,7]. The complex composition of drone brood determines the number of pharmacological characteristics of this bee product, and in particular, the presence of antioxidant, immunotropic, adaptogenic, and anabolic actions [10]. In terms of the variety of vitamin content, drone brood homogenate ranks first among all beekeeping products, ahead of even royal jelly [11].

Drone brood is often referred to as the male equivalent of royal jelly due to its very similar chemical composition. Royal jelly is a substance secreted by the hypopharyngeal and mandibular glands of worker honeybees [1,3]. On average, royal jelly contains about 60% water, 12% sugar, 12% protein, 6% lipids, and 5% organic acids, sex hormones, minerals, and vitamins (C, D, E, B), which makes it a valuable bioactive product [3,12–14]. The antioxidant potential of royal jelly is attributed to its polyphenols content, mainly flavonoids [4,9,15–20]. Using a DPPH radical scavenging capacity assay, the researchers confirmed the antioxidant capacity of royal jelly at levels in the range of 30–80% of radical residue [14,17,18]. Antioxidant capacity was determined using FRAP assays, resulting in 180–220 mM Fe/100 g [14,17], while total phenolics measured by a Folin-Ciocalteu assay amounted to 23.49 mg GAE/100 g, on average [17]. It is assumed that both bee products, drone brood and royal jelly, show similar biological activity, and thus, antioxidant properties [7]. However, the composition of drone milk has been poorly studied with respect to the protein, amino acids, lipids, hormones, vitamins, and bioelements that make it a good source of antioxidants [10,11,21]. Flavonoids and other phenolic compounds are important components that contribute to the ability of drone brood to reduce oxidative stress and prevent cardiovascular diseases [22], but still have not been recognized.

So far, preliminary studies of the chemical composition and biological activity of drone brood have been carried out and demonstrated its high content of nutrients and bioelements. However, research on the antioxidant activity of this bee product as well as the influence of various environmental and biological factors on the antioxidant properties of drone brood is still lacking. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of the stage of larval development and method of preservation on the antioxidant properties of drone brood homogenates.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

The chemicals [2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine], reagents (Folin-Ciocalteu reagent), and standards (p-coumaric acid, apigenin-7 glucoside, ferulic acid, naringenin, chrysin, and quercetin) were obtained from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA), and buffer components (chloroform, ethyl acetate, and formic acid) were purchased from Avantor Performance Materials Poland SA (APM, Gliwice, Poland).

2.2. Drone Brood Homogenates

Drone brood (7-, 11-, and 14-day-old) samples were collected from three apiaries distant from each other by at least 50 km in the southeastern part of Poland (Podkarpackie

Voivodeship) during May and June 2020. Drone brood (50 g of each sample) of the *Apis mellifera carnica* was selected manually from the one-half drone frame, immediately sealed in sterile containers, and transferred to the laboratory. Each sample was homogenized using a tissue homogenizer with 7 mm plastic Omni Tips™ (TH 02, Omni International, Kennesaw, GA, USA). One part of the material was frozen at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, and then freeze-dried (using Alpha 1–2, LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Germany). Dehydration was carried out for 72 h by cooling the sample to $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ at a standard pressure of 0.1 bar. The second part of the material was frozen at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Drone brood samples were used in the experiments in both forms: freeze-dried or frozen, both ground in a mortar before analysis.

2.3. Preparation of Drone Brood Extract

Half a gram of drone brood sample (freeze-dried powder or defrosted homogenate) was extracted with 5 mL of distilled water or 70% ethyl alcohol. The samples were homogenized with a tissue homogenizer (TH 02, Omni International, Kennesaw, GA, USA) for 2 min at medium speed (15,000 rpm). The extracts were then centrifuged for 20 min at 10,000 rpm at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ using a refrigerated centrifuge (MPW-351R, Med. Instruments, Warsaw, Poland). The supernatants were collected and then filtered through a $0.45\text{ }\mu\text{m}$ nylon syringe filter and stored in a refrigerator at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further analysis, but not longer than 3 days. Before antioxidant activity tests, the extracts were diluted 10-fold using a proper solvent.

2.4. Antioxidants Assay

2.4.1. DPPH Test

The inhibition of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radicals was measured according to the method previously used in our laboratory for honey analysis [23] with slight modifications. Twenty microliters of drone brood diluted extract was mixed with $180\text{ }\mu\text{L}$ of DPPH radical methanolic solution (0.1 mM) and kept in the dark for 30 min. In the control sample, the extract was replaced by proper solvent. After incubation, the absorbance of the test and control samples were measured at 517 nm in a microplate reader (EPOCH 2 microplate spectrophotometer, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). The reduction of DPPH radicals (AA%) was calculated using the following equation:

$$\text{AA}\% = [(\text{A}_o - \text{A}_s) / \text{A}_o] \times 100,$$

where AA% is antioxidant activity, A_o is the absorbance of the control, and A_s is the absorbance of the tested samples.

2.4.2. FRAP Test

The ferric reducing antioxidant powder (FRAP) test was performed according to Džugan et al. [23]. The FRAP reagent contained 2.5 mL of a 10 mM solution of 2,4,6-tripyridyltriazine (TPTZ) in 40 mM HCl, 2.5 mL of 20 mM FeCl_3 , and 25 mL of 0.3 M acetate buffer (pH 3.6). To $20\text{ }\mu\text{L}$ of diluted extract, $180\text{ }\mu\text{L}$ of FRAP reagent was added, and after incubation at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min, the absorbance of the reaction mixture was measured spectrophotometrically at 593 nm (EPOCH 2) against a blank. Results were expressed as mmol Trolox equivalents (TE) per 100 g of drone brood sample (mmol/100 g) from the calibration curve prepared for Trolox in the range of 5–60 nmol/mL ($y = 0.152x$, $R^2 = 0.999$).

2.4.3. ABTS Test

The antioxidant capacity was determined using the ABTS test (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) according to the method described by Re et al. [24] with slight modifications. ABTS solution (19.5 mg ABTS in 7.00 mL of distilled water) was mixed with 3.3 mg of potassium persulfate and stored in the dark for 24 h. Before use, it was diluted with phosphate buffer (0.1M, pH = 7.4) to obtain an absorbance value at 734 nm of about 0.7. Then $20\text{ }\mu\text{L}$ of each diluted drone brood extract was mixed with $180\text{ }\mu\text{L}$ of diluted ABTS radical solution. After 6 min incubation in the dark, the absorbance of

each sample was recorded at 734 nm in an EPOCH 2 microplate reader against phosphate buffer. Results were calculated using the following equation:

$$\text{ABTS\%} = [\text{Ao} - \text{As}] / \text{Ao} \times 100,$$

where Ao is the absorbance of the control and As is the absorbance of the tested samples.

2.5. Total Phenolic Content (TPC) Determination

The total content of phenolic compounds was determined using the Folin-Ciocalteu reagent according to Džugan et al. [23] with minor modifications. To 20 µL of diluted drone brood extract, 100 µL of 10% Folin-Ciocalteu reagent was added, followed by 80 µL of 7.5% (*w/v*) sodium carbonate solution. The samples were kept in the dark for 60 min and then the absorbance was measured against the blank at 760 nm using the EPOCH 2 microplate spectrophotometer. The total content of phenolic compounds was expressed in mg of gallic acid equivalents (GAE) per 100 g of brood sample (mg GAE/100 g). The results were calculated based on a calibration curve prepared for gallic acid in the range of 0–125 µg/mL ($y = 0.336x$, $R^2 = 0.9914$).

2.6. Total Flavonoid Content (TFC) Determination

The total content of flavonoids in the extracts of drone brood was assessed using the method of Biju [25]. One hundred microliters of the undiluted extract was mixed with 100 µL 2% AlCl₃ (in methanol). The reaction mixture was incubated for 10 min at room temperature until the completion of the reaction. The absorbance of the solution was then measured at 415 nm with an EPOCH 2 microplate reader against a methanol blank. The total content of flavonoids in the extracts of drone brood was expressed in mg of quercetin equivalent (QE) per 100 g of brood sample (mg QE/100 g). The results were calculated on the basis of a calibration curve prepared for quercetin in the range of 0–125 µg/mL ($y = 0.0655x$, $R^2 = 0.9999$).

2.7. Identification of Antioxidant Compounds by HPTLC

Analyses of all obtained ethanolic extracts in 70% ethanol of the drone brood samples were performed on HPTLC Silica Gel 60 F₂₅₄ plates (20 cm × 10 cm) purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Forty microliters of each drone brood homogenate extract were applied to the plate as 11 mm bands from the lower edge of the plate at the rate of 200 nL/s using a semi-automated HPTLC application device (Linomat 5, CAMAG, Muttenz, Switzerland). The chromatographic separation was performed in a chromatographic tank saturated for 20 min with the mobile phase composed of chloroform: ethyl acetate: formic acid [5:4:1 v:v:v], and developed to a distance of 85 mm. The obtained results were documented using an HPTLC imaging device (TLC Visualizer, CAMAG, Muttenz, Switzerland) under white light, 254 and 366 nm. In addition, each plate was derivatized with 0.05% DPPH reagent (in methanol) using an automated TLC derivatizer (CAMAG Derivatizer, Muttenz, Switzerland). After derivatization, the plates were imaged under white light and 366 nm. The obtained chromatographic images were analyzed using HPTLC software (Vision CATS, CAMAG, Muttenz, Switzerland).

2.8. Statistical Analysis

All calculations were made in triplicate. For the obtained data, mean values and standard deviations were calculated. The correlations between the obtained parameters were analyzed by Pearson coefficient (*r*). Significant differences were calculated by two-way analysis of variance followed by NIR Fisher's test of significant difference ($p < 0.05$). Multidirectional analysis of variance with the Wilks test was performed to determine the influence of independent factors as well as the interactions between them at the significance level $p = 0.05$. Principal component analysis (PCA) was used to find the relationship between the parameters tested in drone brood depending on the developmental stage and the method of fixation. All calculations were made using the Statistica 13.3 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

3. Results

3.1. Antioxidant Activity (Measured by DPPH, ABTS, FRAP), Total Phenolic and Flavonoid Content of Frozen Drone Brood Homogenates

In the first step of the study, the antioxidant activity of extracts obtained from frozen drone brood samples was measured with the DPPH, ABTS, and FRAP methods. Moreover, total polyphenol and flavonoid content were analyzed. The comparison covered brood collected from three apiaries (I, II, III) at three different stages of larval development (day 7, 11, and 14). Additionally, the examination of brood homogenate extracts obtained with two solvents, water and 70% ethanol, was performed on the basis of earlier findings [6], where significant differences between these two extracts were noticed. The results are presented in Table 1.

Table 1. Antioxidant activity (measured with DPPH, ABTS, and FRAP methods) and total phenolic and flavonoid content of frozen drone brood homogenates extracted with water and 70% ethanol.

Developmental Stage	Extractant	Apiary I	Apiary II	Apiary III	Average
Antioxidant Activity DPPH [%] (<i>n</i> = 3) (±SD)					
7-day-old	water	14.3 ^b ± 0.1	16.4 ^c ± 1.1	11.9 ^a ± 0.5	14.2 ± 2.2
	ethanol 70%	5.3 ^{DE} ± 0.1	5.8 ^{DE} ± 0.4	1.7 ^B ± 0.1	4.3 ± 2.2
11-day-old	water	24.8 ^d ± 0.4	23.2 ^d ± 1.6	12.4 ^a ± 0.2	20.1 ± 6.7
	ethanol 70%	4.4 ^{CDE} ± 0.4	4.2 ^{CD} ± 1.2	3.3 ^{BC} ± 0.1	4.0 ± 0.6
14-day-old	water	15.8 ^{bc} ± 0.2	16.9 ^c ± 1.4	11.2 ^a ± 0.6	14.7 ± 3.0
	ethanol 70%	3.0 ^{BC} ± 0.1	6.0 ^E ± 0.9	0.00 ^A	3.0 ± 3.0
Antioxidant Activity ABTS [%] (<i>n</i> = 3) (±SD)					
7-day-old	water	13.5 ^d ± 0.5	7.3 ^b ± 1.0	17.2 ^e ± 0.2	12.7 ± 4.9
	ethanol 70%	20.2 ^{BC} ± 0.7	21.4 ^C ± 2.6	19.4 ^B ± 0.6	20.4 ± 1.0
11-day-old	water	2.8 ^a ± 0.2	5.5 ^{ab} ± 0.2	10.5 ^c ± 0.4	6.3 ± 3.9
	ethanol 70%	24.9 ^D ± 0.5	21.5 ^C ± 3.1	16.4 ^A ± 1.6	21.0 ± 4.3
14-day-old	water	7.5 ^b ± 0.2	11.4 ^{cd} ± 1.0	15.8 ^e ± 0.5	11.6 ± 4.2
	ethanol 70%	24.3 ^D ± 2.4	21.4 ^C ± 2.1	16.2 ^A ± 1.0	20.7 ± 4.1
Ferric Reducing Antioxidant Power FRAP [mmol/100 g] (<i>n</i> = 3) (±SD)					
7-day-old	water	1.0 ^{abcd} ± 0.1	1.2 ^{de} ± 0.1	0.9 ^{ab} ± 0.1	1.0 ± 0.1
	ethanol 70%	0.4 ^A ± 0.1	0.6 ^A ± 0.1	0.5 ^A ± 0.0	0.5 ± 0.1
11-day-old	water	1.1 ^{cde} ± 0.0	0.9 ^a ± 0.1	1.3 ^e ± 0.1	1.1 ± 0.2
	ethanol 70%	0.6 ^A ± 0.0	0.5 ^A ± 0.1	0.5 ^A ± 0.0	0.5 ± 0.0
14-day-old	water	0.9 ^a ± 0.0	0.9 ^{abc} ± 0.1	1.1 ^{bcde} ± 0.2	0.9 ± 0.1
	ethanol 70%	0.5 ^A ± 0.1	0.5 ^A ± 0.9	0.4 ^A ± 0.1	0.5 ± 0.0
Total Phenolic Content TPC [mg GAE/100 g] (<i>n</i> = 3) (±SD)					
7-day-old	water	234.6 ^b ± 10.0	267.9 ^e ± 14.2	251.5 ^c ± 14.5	251.3 ± 16.6
	ethanol 70%	74.4 ^B ± 9.2	101.2 ^G ± 10.3	91.8 ^E ± 10.2	89.1 ± 13.6
11-day-old	water	282.7 ^f ± 12.6	320.4 ^h ± 9.3	256.0 ^d ± 10.5	289.4 ± 32.4
	ethanol 70%	69.9 ^A ± 7.2	95.2 ^F ± 9.1	80.4 ^D ± 9.0	81.8 ± 12.7
14-day-old	water	224.7 ^a ± 10.1	285.2 ^g ± 7.4	225.7 ^a ± 10.0	245.2 ± 34.7
	ethanol 70%	78.9 ^{CD} ± 10.3	104.7 ^H ± 12.2	77.4 ^C ± 10.1	87.0 ± 15.3
Total Flavonoid Content TFC [mg/100 g] (<i>n</i> = 3) (±SD)					
7-day-old	water	9.9 ^{cde} ± 1.2	6.7 ^b ± 0.2	9.5 ^{cd} ± 0.2	8.7 ± 1.7
	ethanol 70%	0.8 ^A ± 0.1	0.6 ^A ± 0.3	0.6 ^A ± 0.1	0.7 ± 0.1
11-day-old	water	10.9 ^{de} ± 0.7	10.3 ^{cde} ± 0.2	11.5 ^e ± 0.2	10.9 ± 0.6
	ethanol 70%	1.0 ^A ± 0.1	0.7 ^A ± 0.1	1.3 ^A ± 0.1	1.0 ± 0.3
14-day-old	water	9.0 ^c ± 1.0	4.1 ^a ± 0.2	6.8 ^b ± 0.1	6.7 ± 1.9
	ethanol 70%	1.5 ^A ± 0.1	0.4 ^A ± 0.1	1.2 ^A ± 0.1	1.0 ± 0.6

a, b, c, d, e, f, g, h— for aqueous extracts lowercase superscript letters indicate significant differences for data in columns (apiary number) and rows (developmental stage) obtained by two-way ANOVA (NIR Fisher test, *p* < 0.05). A, B, C, D, E, F— for ethanolic extracts uppercase superscript letters indicate significant differences for data in columns (apiary number) and rows (developmental stage) obtained by two-way ANOVA (NIR Fisher test, *p* < 0.05). SD is the standard deviation.

Among tested aqueous extract samples, the highest antiradical activity (DPPH test) was found for the 11-day-old drone brood, in comparison to days 7 and 14 or apiaries I and II ($p < 0.05$). Any significant differences ($p > 0.05$) were observed for the 7- and 14-day-old drone brood aqueous extracts. Lower levels of antioxidant potential in 70% ethanol extracts were found, with the lowest for 14-day-old and highest for 7-day-old drone brood.

The analysis of antioxidant potential measured with ABTS reagent showed an inverse correlation with the DPPH results (Table 1). The activity of homogenates extracted with 70% ethanol was found to be higher than that of the aqueous extracts, and an inverse relationship was observed for aqueous extracts, where the 11-day-old drone brood showed the lowest activity on average.

Minor differences between samples were observed for reducing potential (in FRAP test). When analyzing the mean values of homogenate activity, the same relationship as confirmed by the DPPH method was observed, where 11-day-old drone brood showed the strongest activity, while slightly lower activity was found with the 7- and 14-day-old samples ($p < 0.05$). The use of 70% ethanol as the extractant resulted in a lower ability to reduce Fe(III) ions by about 48% in all tested extracts, with the same tendency observed in all developmental stages.

High phenolic compound content was found in the aqueous-extract frozen drone brood. A statistically significant relationship ($p < 0.05$) was found between the developmental stage and the polyphenol content, regardless of the apiary origin of the sample. Similarly to the DPPH and FRAP methods, the mean content of polyphenols was the highest on day 11 of development, but decreased in the 14-day-old brood. A similar relationship was observed for ethanolic extracts, where the content of phenolic compounds was 65–70% lower and differed significantly depending on the stage of development and apiary origin ($p < 0.05$).

For flavonoids as well, water proved to be a better extractant than 70% ethanol. The highest level was shown for 11-day-old drone brood regardless of apiary origin ($p > 0.05$). Moreover, average flavonoid content in brood on day 14 of development decreased by 38.8% compared to day 11 of development ($p < 0.05$).

3.2. Antioxidant Activity (Measured by DPPH, ABTS, FRAP), Total Phenolic and Flavonoid Content of Freeze-Dried Drone Brood Homogenates

In the second step of the study, the antioxidant activity (DPPH, ABTS, FRAP methods), as well as total polyphenol and flavonoid content, were analyzed in extracts of freeze-dried drone brood (Table 2). The comparison was arranged in the same manner as in Section 3.1. The highest antiradical activity measured with the DPPH method was observed in 11-day-old drone brood. The obtained value was significantly different ($p < 0.05$) from the other results, both in terms of apiary origin and developmental stage. The lowest activity was observed in 14-day-old brood collected from apiary III. The observed relationship was the same as demonstrated for frozen brood. Similarly, the use of 70% ethanol as an extractant resulted in a decrease in the antioxidant activity of the tested extracts, by 70%. In this case, significant changes in antioxidant activity depending on the apiary origin of brood were demonstrated ($p < 0.05$).

In lyophilized preparations, the results for antioxidant activity measured with the ABTS test were higher for 70% ethanolic extracts compared to aqueous counterparts. Moreover, regardless of the stage of maturity and extractant used, the high variability ($p < 0.05$) in antioxidant potential was observed to be dependent on the apiary origin of the samples.

The highest reducing power (FRAP test) was observed with 11-day-old drone brood extracted with water, while the lowest was observed with 14-day-old brood ethanolic extract. The use of ethanol as an extractant resulted in a decrease in reducing ability of extract, by an average of 73% for 7- and 11-day-old brood and 80% for 14-day-old brood. The differences in activity were significant between apiaries ($p < 0.05$) and developmental stages ($p < 0.05$).

Table 2. Antioxidant activity (measured with DPPH, ABTS, FRAP methods) and total phenolic and flavonoid content of freeze-dried drone brood homogenates extracted with water and 70% ethanol.

Developmental Stage	Extractant	Apiary I	Apiary II	Apiary III	Average
Antioxidant Activity DPPH [%] (<i>n</i> = 3) (±SD)					
7-day-old	water	51.0 ^d ± 0.4	41.9 ^b ± 1.6	57.4 ^f ± 0.9	50. ± 5.3
	ethanol 70%	20.5 ^F ± 0.1	13.9 ^E ± 2.6	10.4 ^C ± 1.6	14.9 ± 5.1
11-day-old	water	61.3 ^g ± 0.2	53.0 ^e ± 0.6	51.5 ^{de} ± 0.6	55.2 ± 7.8
	ethanol 70%	20.2 ^F ± 3.8	15.3 ^E ± 1.1	8.2 ^B ± 0.5	14.6 ± 6.0
14-day-old	water	57.2 ^f ± 1.1	44.5 ^c ± 1.0	37.4 ^a ± 0.4	43.3 ± 10.0
	ethanol 70%	6.3 ^A ± 1.3	15.4 ^E ± 1.1	13.0 ^{DE} ± 1.6	11.5 ± 4.7
Antioxidant Activity ABTS [%] (<i>n</i> = 3) (±SD)					
7-day-old	water	36.6 ^e ± 0.4	25.9 ^c ± 1.0	49.5 ^g ± 0.5	37.3 ± 11.9
	ethanol 70%	68.2 ^E ± 1.3	70.9 ^F ± 1.6	56.5 ^C ± 1.1	65.2 ± 7.7
11-day-old	water	6.3 ^a ± 3.7	19.9 ^b ± 0.5	28.8 ^d ± 0.4	18.3 ± 11.3
	ethanol 70%	64.3 ^D ± 0.3	71.3 ^F ± 0.4	44.9 ^B ± 0.4	60.1 ± 13.7
14-day-old	water	30.0 ^d ± 0.3	30.4 ^d ± 0.3	40.2 ^f ± 0.3	33.5 ± 5.8
	ethanol 70%	68.8 ^E ± 0.4	32.1 ^A ± 0.5	55.9 ^C ± 0.3	52.3 ± 18.6
Ferric Reducing Antioxidant Power FRAP [mmol/100 g] (<i>n</i> = 3) (±SD)					
7-day-old	water	3.0 ^d ± 0.2	2.2 ^a ± 0.1	20.9 ^d ± 0.1	2.7 ± 0.4
	ethanol 70%	0.8 ^C ± 0.1	0.7 ^{BC} ± 0.0	0.6 ^B ± 0.0	0.7 ± 0.1
11-day-old	water	3.2 ^e ± 0.2	2.6 ^c ± 0.1	3.4 ^f ± 0.2	3.0 ± 0.4
	ethanol 70%	1.0 ^D ± 0.0	0.7 ^{BC} ± 0.0	0.7 ^{BC} ± 0.9	0.8 ± 0.2
14-day-old	water	2.4 ^b ± 0.1	2.2 ^a ± 0.1	2.0 ^a ± 0.1	2.2 ± 0.2
	ethanol 70%	0.4 ^A ± 0.1	0.6 ^{BC} ± 0.0	0.4 ^A ± 0.0	0.5 ± 0.2
Total Phenolic Content TPC [mg GAE/100 g] (<i>n</i> = 3) (±SD)					
7-day-old	water	827.3 ^c ± 29.8	699.9 ^b ± 32.4	731.2 ^b ± 24.6	763.9 ± 66.4
	ethanol 70%	279.3 ^D ± 17.5	281.3 ^E ± 21.0	231.2 ^C ± 13.5	263.9 ± 28.4
11-day-old	water	1005.0 ^d ± 28.2	832.8 ^c ± 18.0	984.1 ^d ± 24.6	940.6 ± 94.0
	ethanol 70%	399.3 ^H ± 14.6	298.6 ^G ± 17.0	144.8 ^A ± 16.6	280.9 ± 128.2
14-day-old	water	640.9 ^a ± 91.2	811.0 ^c ± 20.3	829.4 ^c ± 14.0	760.4 ± 103.9
	ethanol 70%	200.4 ^B ± 18.1	290.2 ^F ± 21.0	284.7 ^E ± 18.6	258.4 ± 50.3
Total Flavonoid Content TFC [mg/100 g] (<i>n</i> = 3) (±SD)					
7-day-old	water	104.5 ^g ± 1.2	73.6 ^d ± 5.7	59.2 ^b ± 1.1	79.0 ± 23.2
	ethanol 70%	43.8 ^D ± 1.1	18.4 ^B ± 1.2	15.0 ^A ± 4.8	25.7 ± 15.7
11-day-old	water	122.0 ^h ± 1.1	72.4 ^d ± 3.0	87.5 ^f ± 2.2	94.0 ± 25.4
	ethanol 70%	49.8 ^E ± 5.1	54.0 ^F ± 3.8	17.6 ^B ± 0.5	40.5 ± 19.9
14-day-old	water	82.3 ^e ± 5.8	63.2 ^c ± 3.7	42.5 ^a ± 4.3	62.7 ± 19.9
	ethanol 70%	19.2 ^B ± 2.1	57.2 ^G ± 4.1	22.6 ^C ± 1.2	33.0 ± 21.0

a, b, c, d, e, f, g, h—for aqueous extracts lowercase superscript letters indicate significant differences for data in columns (apiary number) and rows (developmental stage) obtained by two-way ANOVA (NIR Fisher test. $p < 0.05$). A, B, C, D, E, F—for ethanolic extracts uppercase superscript letters indicate significant differences for data in columns (apiary number) and rows (developmental stage) obtained by two-way ANOVA (NIR Fisher test. $p < 0.05$). SD is the standard deviation.

Similarly to frozen brood, the lyophilizates were characterized by high phenolic compound content. The highest average content was observed with 11-day-old brood homogenate. The use of ethanol for extraction resulted in a decrease in content of the tested compound, on average by 65% for 7- and 14-day-old brood and 71% for 11-day-old brood.

The analysis of the flavonoid level in brood extracted with water and fixed by lyophilization showed the highest levels on average in 11-day-old brood samples, with the highest content in the brood obtained from apiary I. Brood origin significantly influenced flavonoid content ($p < 0.05$). What is more, the developmental stage significantly affected total flavonoid content ($p < 0.05$). The use of ethanol as an extractant resulted in a significant reduction in the content of the tested compounds in extracts, by 47 to 67%.

3.3. Loss of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity during Freeze-Drying of Drone Brood Homogenate

The white-yellow powder obtained by lyophilization after reconstitution in water formed a white-yellow, milky suspension strongly resembling refrosted homogenate of drone brood. Moreover, both samples behaved analogously when they were extracted with water and ethanol. The data presented in Tables 1 and 2 may lead directly to the wrong conclusion that frozen drone brood contains less antioxidants, phenolic compounds, and flavonoids. However, the differences in the content of the discussed compounds were due to different expressions of the data: wet mass for frozen drone brood and dry mass for freeze-dried drone brood. When the results for frozen homogenates were converted into dry mass (using the loss of water during freeze-drying), direct comparison to freeze-dried brood was then possible. A slight decrease in antioxidant compound activity (by 6–10%) and total phenolic compound content (by 7–11%) during the lyophilization process was observed ($p > 0.05$). Comparisons of results for TPC (Figure 1) and FRAP (Figure 2) are shown below.

3.4. Statistical Analysis

The results for the antioxidant activity of frozen brood showed strong positive correlations with the DPPH, FRAP, TPC, and TFC parameters (Table S1) measured by Pearson correlation coefficient ($r = 0.838–0.929$). Conversely, the ABTS results showed a strong negative correlation with all other tested parameters. A similar trend was observed for the freeze-dried bee product. The results of the DPPH, FRAP, and TPC, as well as TFC assays, showed a strong positive correlation ($r = 0.814–0.929$). In this case, a strong positive correlation for the ABTS and other results was observed, excluding the DPPH method ($r = -0.828$). A strong positive correlation was found between the results for frozen and freeze-dried brood, where correlation coefficients for all parameters were above 0.82 (Table S1).

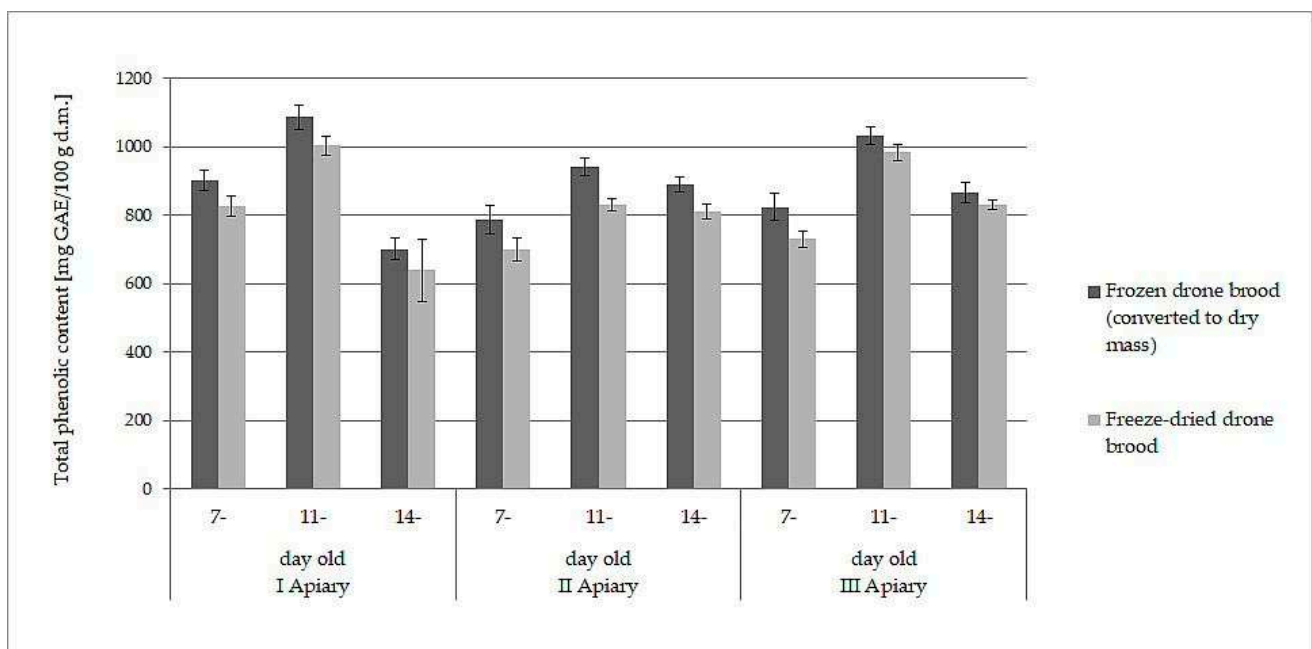


Figure 1. Comparison of total phenolic content (expressed as dry mass) in frozen and freeze-dried drone brood at different stages of development (7-, 11-, and 14-day-old larvae).

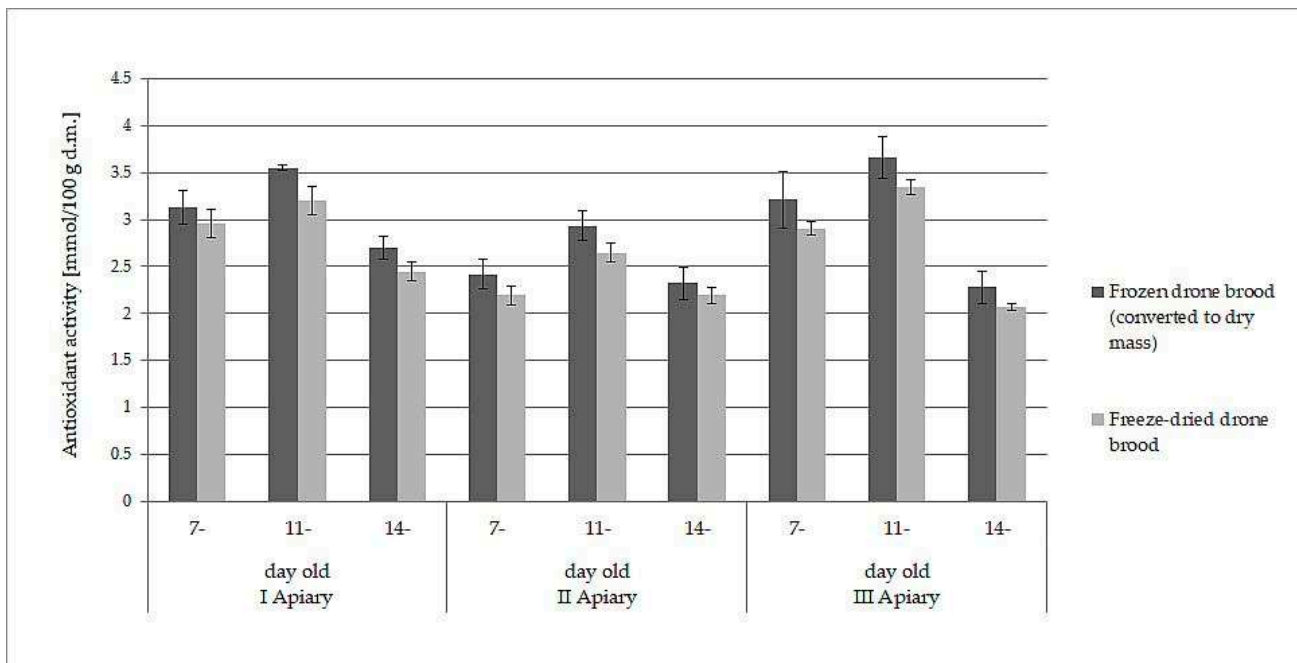


Figure 2. Comparison of antioxidant activity (FRAP method, expressed as dry mass) in frozen and freeze-dried drone brood at different stages of development (7-, 11-, and 14-day-old larvae).

The relationships between the determined parameters for drone brood samples were verified by principal component analysis (PCA) (Figure 3). Variables displayed in Figure 3a confirmed the strongest positive correlation between the DPPH, FRAP, TPC, and TFC methods, demonstrated by close proximity. Conversely, a negative correlation was demonstrated between the antioxidant activity measured by ABTS and other assays, which were located in different areas of the biplot. Moreover, it can be noticed that all examined parameters had a significant impact on overall drone brood quality due to their location close to the projection circle. The analysis showed that the tested samples were characterized by high heterogeneity (Figure 3b), and it was not possible, based on the tested parameters, to clearly classify the samples in terms of geographical origin, developmental stage, or solvent used.

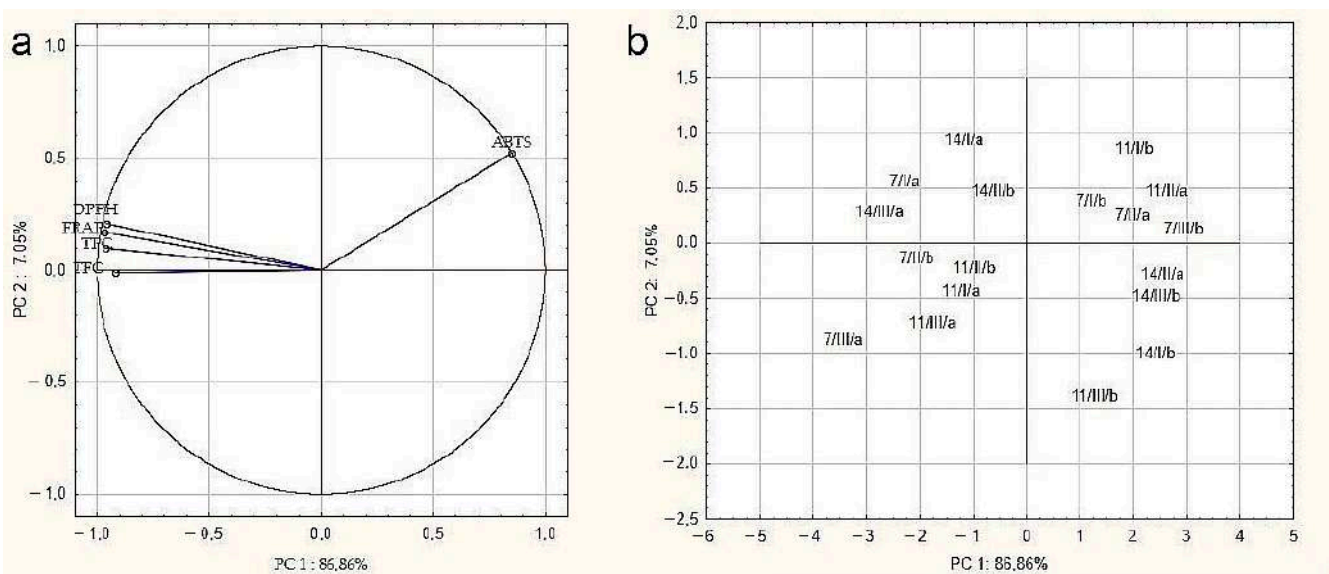


Figure 3. Principal component analysis (PCA)—(a) biplot of scores and loadings of data obtained for antioxidant activity, total phenolic compounds, and flavonoid content of tested drone brood samples; (b) the scatter plot of results in the space of the first two main components (7, 11, 14 days of development/I,II, III-apiary number/a, b- extractant: a- water, b- ethanol).

The results were also examined by multivariate significance test (Wilks test). The developmental stage and location of the apiary were found to have a significant influence on the values of tested parameters of biological activity. The interaction effect between the main factors was evidenced by the test probability level ($p = 0.08$) for the apiary number and developmental stage.

3.5. High-Performance Thin Layer Chromatography Polyphenolic Profile

High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) recently has been applied in the profiling of phenolic compounds in various types of products. During HPTLC separation, polyphenols occur as bands of different intensity, which is crucial for the construction of characteristic fingerprints [26,27]. Using the CAMAG system, it is possible to visualize the polyphenolic profiles of multiple samples simultaneously under identical separation conditions. Such analyses have been intensively studied for use in quality assessments of bee products [28,29].

Drone brood has not been analyzed before in terms of its phenolic compound profile, but according to the literature, it is expected to show a composition similar to royal jelly [5,11]. Therefore, based on research relating to the analysis of the phenolic compound profile for royal jelly, the following standards were selected: *p*-coumaric acid, apigenin 7-glucoside (api 7-glu), ferulic acid, naringenin, chrysin, and quercetin [30]. Preliminary tests applying aqueous and ethanolic extracts to TLC plates yielded better band quality, were easier to perform, and required less time to apply the ethanol-extracted drone brood samples; a version of this approach was therefore selected for thin-layer chromatography analysis.

The chromatograms showing the separation of phenolic acids and flavonoids in the frozen drone brood homogenates are demonstrated in Figure 4. Obtained profiles contained both blue (typical of phenolic acids) and yellow (characteristic of flavonoids) bands [31]. The identification of phenolic compounds was performed on the basis of R_f values and colors of the selected standard bands (Table S2). The HPTLC chromatograms indicated strong similarities in composition between the identified compounds and drone brood samples of different stages of development and apiary origin.

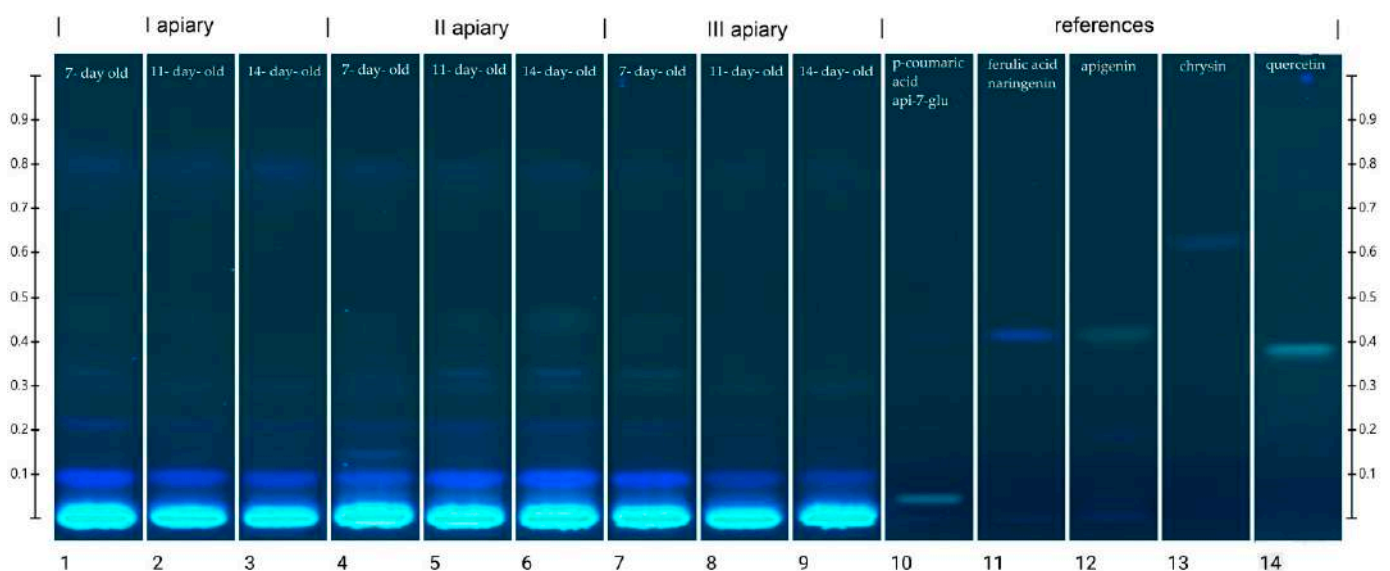


Figure 4. HPTLC chromatogram of phenolic compounds at 366 nm in frozen drone brood homogenates (1–9). Phenolic compound standards used: (10) *p*-coumaric acid, apigenin 7-glucoside (api 7-glu), (11) ferulic acid, naringenin, (13) chrysin, (14) quercetin.

The location of the bands and their color intensity on the TLC chromatogram corresponds to qualitative and quantitative differences in the tested substance, respectively. The analysis of the chromatogram of the drone brood homogenate showed yellow and blue

bands as dominant (Figure 4). In all tested extracts, the presence of phenolic acids with blue bands in the UV₃₆₆ light was confirmed, and two major compounds with the retention coefficients $R_f = 0.09$ and $R_f = 0.22$ were observed (Table S3). The intensity of the bands was used to estimate the approximate content of a particular compound (Table S3). It was found that the 7-day-old brood, regardless of the apiary of origin, was the richest source of phenolic acids, while the poorest source was the 14-day-old. Moreover, all bands in the sample from apiary II identified as phenolic acids occurred at the highest intensity. In the drone brood, apigenin, one of the flavonoids, was also identified as a yellow band under UV₃₆₆ light. The most intense color of this band was found in extracts from apiary II, for the 14-day-old brood, whereas the least visible apigenin bands were found for extracts from apiary I (Table S3). Moreover, flavonoids with the retention factor $R_f = 0.30$ (pale yellow), as well as two compounds with the retention factor $R_f = 0.33$ (pale blue) and $R_f = 0.80$ (blue) were detected in the studied extracts of drone brood. Due to the limited availability of reference substances and an unrecognized topic, no detailed identification of these compounds was possible.

The plate was developed with 0.05% methanolic 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) reagent, followed by drying for 2 min in a derivatization chamber (Figure 5). The obtained results were documented using an HPTLC imaging device. In this derivatization method, the plates show yellow bands on the violet background due to the discoloration of the DPPH reagent in reaction to components with antiradical properties. The most intense discoloration was observed for bands with an R_f coefficient of approx. 0.34 and approx. 0.22 (Table S3). The first of these compounds was dominant in samples from apiary II and the second, in samples from apiaries I and III, especially in the 14-day-old brood. Based on the comparison with the data in Figure 4, it can be concluded that these bands show a blue color at 366 nm and can be assigned to the group of phenolic acids. Among the tested polyphenol standards, naringenin, ferulic acid, and apigenin showed the strongest antiradical activity, manifested as intense yellow bands.

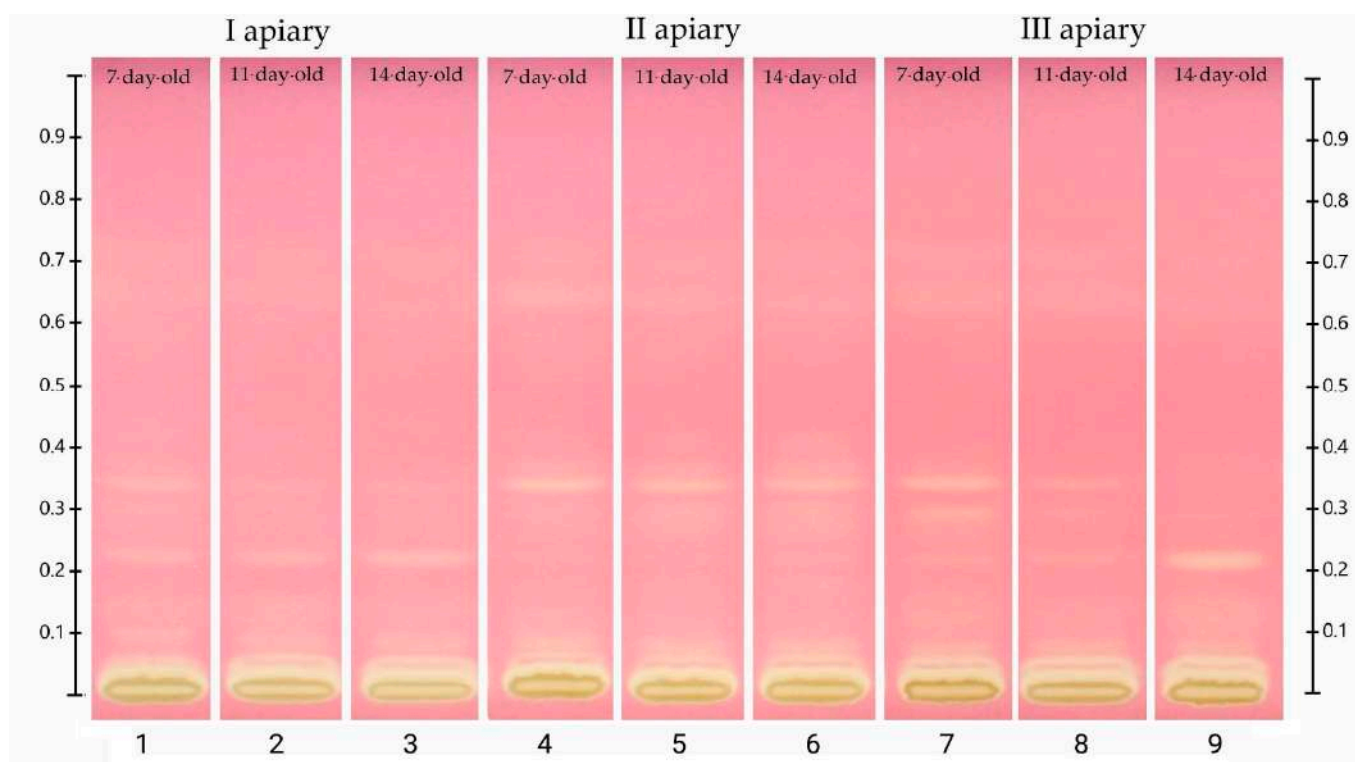


Figure 5. HPTLC chromatogram after derivatization with developing reagent (0.05% DPPH); (1–3 apiary I, 4–6 apiary II, 7–9 apiary III).

4. Discussion

Drone brood is a valuable bee product; however, it is strongly unstable after removal from the comb. Thus, fixing the brood by lyophilization is a modern but rarely used method that maintains the stability of the homogenate without reducing the quality of the tested material [32]. It was found that after re-dissolving in water, freeze-dried brood showed the same color and consistency as the raw homogenate. Moreover, both frozen and freeze-dried homogenates were observed to have low solubility in water. In turn, the extraction with ethanol was also problematic and resulted in the formation of a large amount of precipitate, possibly containing proteins. The low solubility of the homogenate in water and extraction of only low molecular antioxidants with ethanol may lead to analytical difficulties and non-reproducibility of results.

Both aqueous and ethanolic extracts of drone brood homogenates were examined with standard methods used in the antioxidant analysis of biological samples. The purpose of using two different solvents (water, 70% ethanol) was to diversify the hydrophilic and hydrophobic fractions of antioxidants present in the brood as well as to allow for comparison with data reported in the literature. It was found that the younger the age of the larvae tested, the higher the activity observed. The 11-day-old brood showed the highest antioxidant activity while the lowest was observed with the 14-day-old brood (Tables 1 and 2). When comparing drone broods at the same stage of development, statistically significant differences were found to be related to the apiary of origin. The brood from apiary II showed the highest antioxidant activity, whereas that from apiary III had the lowest. Both apiaries were located closer to each other and did not differ from apiary I, which was located at a greater distance. This suggests that geographical origin is of less importance to a brood's characteristics than hive conditions, as was earlier reported [33,34].

In terms of the antioxidant potential of drone brood, the obtained results were in agreement with other author findings. Silici [35] examined the bioactivity of apilarnil (7-day-old brood) and showed total phenolic content in the range of 760–940 mg GAE/100 g and DPPH values of aqueous extracts up to 81% under the same analytical conditions [35]. Although developmental changes in antioxidant potential of drone brood were demonstrated for the first time, a similar study on drone brood amino acids reported an increase in aspartic acid, glutamic acid, cysteine, and lysine content corresponding with the developmental phase of the drone brood; these increases, can also improve the activity of brood in alleviating oxidative stress [11,36,37]. Developmental changes in nutritional value for bee male larvae were studied only by Ghosh et al. [37], who analyzed, among other factors, the antioxidant properties of ethanolic extracts of Danish Buckfast honeybee drone larvae (fifth larval instars from the open-cell phase), pupae (brood with a dark eye), and adults (right after biting out of the comb). The cited authors reported antioxidant activity measured with the DPPH test for larvae and late pupae at levels of 6% and 26%, respectively, which can be compared to our results where the activity between 7- to 14-day-old larvae ranged from 11 to 14.5%. Moreover, the cited study [37] checked antioxidant activity with the ABTS reagent and found higher activity in ethanolic extracts (40% for adult drones). A similar relationship was observed in our study, where the activity for ethanolic extracts was higher than that observed for aqueous extracts and amounted to 52–65%.

The high biological activity of drone brood was confirmed by several reference methods, and the results were well-correlated, except for the ABTS method (Table S1). The aqueous extracts were more abundant in antioxidants compared to ethanolic ones regardless of the method used, and only in the ABTS test was an adverse relationship observed. In the case of aqueous extracts, the proteins (including enzymes), vitamins, and water-soluble polyphenols may be considered as antioxidant components. However, drone brood antioxidants are represented also by unsaturated fatty acids in free and bound form, including unique decenoic acids [7,38] and some hydrophobic phenolic compounds, which can be 15–30 times more active in scavenging free radicals [39]. These components probably influenced the antioxidant activity of ethanolic protein-free extracts.

Although the ABTS and DPPH tests can be comparable, and both are applied for the determination of lipophilic and hydrophilic antioxidants [40,41], a negative correlation between their results was observed. The adverse relation observed for water extracts can be explained by the following causes: (1) the acidic pH of aqueous extracts (pH 5.0), which can affect the ABTS results [32,33], (2) the greater efficiency of sulfhydryl groups of protein in scavenging of DPPH radicals [42,43], and (3) the possibility of a subsequent reaction of a product formed between the ABTS cation radical and parent compounds, which then reacts more quickly with ABTS [44]. The last cause seems to be the most probable, given that ethanolic extract contained many phenolic acids and flavonoids.

The obtained results indicated that the tested material is a rich source of flavonoids compared to honey, which contains about 5–8 mg/100 g of the tested compounds, but less than propolis, which contains about 379 mg/100 g of flavonoids [45].

As various polyphenols differ in their antioxidant effectiveness [46], the chromatographic profiles of the samples provided basic information about the antioxidant fraction composition and could be helpful as markers of developmental stage. In recent years, high-performance thin-layer chromatography has become an increasingly popular method of analyzing different compounds in bee products such as 10-hydroxy-2-decenoic acid [47], the sugar profile in honey [48], and the profile of phenolic compounds in bee pollen [49]. However, so far, this method has not been used for the analysis of drone brood. As the data on drone brood polyphenols was completely lacking and the composition of royal jelly and brood was presumed to be similar, data reported in the literature for polyphenol analysis of royal jelly were followed. Based on UHPLC-Orbitrap-MS analysis [30], the occurrence of naringenin, genistein, chrysin, apigenin 7-glucoside has been confirmed. However, using the HPTLC method, it was possible to identify only apigenin and confirm the presence of numerous phenolic acids. Probably, the used method was not sensitive enough to detect very low concentrations of other flavonoids. On the other hand, the lack of the above-mentioned compounds in drone brood homogenates may indicate that royal jelly and drone brood differ in their phenolic compound profiles. When the plate was derivatized with DPPH solution, an additional observation about the antiradical potential of separated compounds (bands) was made. Such derivatization of TLC plates is not commonly used. The most intense yellow band demonstrating the strongest DPPH radical reducing effect was observed with the ferulic acid, naringenin, and apigenin standards (Table S2). However, the applied apigenin glycoside did not show any effect, which was consistent with data in the literature suggesting that flavonoid glycosides usually have lower antioxidant activity than aglycons [50,51]. However, the proposed, new detection method (HPTLC-DPPH) allowed confirmation of the antiradical potential of drone brood homogenates.

According to the literature, all bee products are considered to be a potential source of natural antioxidants with order of decreasing activity from propolis to royal jelly, bee bread, pollen, and honey [2,3]. It was shown that drone brood, often considered as the male equivalent of royal jelly, exhibits strong antioxidant properties. Comparing data reported for royal jelly [1,17,18] with those obtained for drone brood in this study, it can be considered that the antioxidant potential of drone brood is more beneficial than royal jelly.

5. Conclusions

The study confirmed that the antioxidant potential of drone brood homogenate depends on the stage of larval development. An increase between 7 and 11 days followed by a reduction at later stages (14 days) was observed. The obtained results support the use of drone brood up to 10 days old, which is technologically beneficial due to the possibility of easily removing larvae from non-capped patch cells. The fixing of drone brood homogenate by the freeze-drying process did not cause significant changes in antioxidant activity when compared in terms of dry mass. Based on the comparison of water and ethanol extraction results, it was found that hydrophilic antioxidants form a major antioxidant fraction of drone brood; this was confirmed by several methods and supported by statistical analysis. The similarity of qualitative polyphenolic profiles of extracts investigated by the HPTLC

method was determined, and the same phenolic acids and flavonoids were identified in drone brood ethanolic extracts regardless of the stage of larval development. Furthermore, the usefulness of the HPTLC method in the identification of polyphenols of drone brood homogenates was demonstrated. Drone brood has valuable antioxidant properties that can be successfully compared with royal jelly. The biological properties reported in the literature for drone brood homogenate can be attributed to its confirmed antioxidant activity. However, further study will be needed to identify the main active substances.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox10050639/s1>, Table S1: Correlation matrix for frozen and freeze-dried drone brood homogenate, Table S2: Characterization of chromatographic bands for reference standards, color and intensity of band, Table S3: Characterization of chromatographic bands for extracts of drone brood homogenates, color and intensity of band in UV₃₆₆ and after derivatization.

Author Contributions: Conceptualization, M.D. and E.S.; methodology, E.S.; software, E.S.; validation, E.S. and M.M.; formal analysis, M.D.; investigation, M.D. and E.S.; resources, E.S.; data curation, E.S.; writing—original draft preparation, E.S.; writing—review and editing, M.T. and M.M.; visualization, E.S.; supervision, M.D.; project administration, E.S.; funding acquisition, M.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the University of Rzeszów research project PB/ZCHTZ/2021.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or supplementary material.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Cornara, L.; Biagi, M.; Xiao, J.; Burlando, B. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Front. Pharm.* **2017**, *8*, 1–20. [CrossRef]
2. Kocot, J.; Kielczykowska, M.; Luchowska-Kocot, D.; Kurzepa, J.; Musik, I. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 7074209. [CrossRef]
3. Martinello, M.; Mutinelli, F. Antioxidant activity in bee products: A review. *Antioxidants* **2021**, *10*, 71. [CrossRef] [PubMed]
4. Bogdanov, S. Royal jelly, bee brood: Composition, Health, medicine: A review. *Lipids* **2011**, *3*, 8–19.
5. Hroshovi, T.; Dobrynchuk, M.; Pavliuk, B.; Chubka, M. Drone brood—As a raw material for the manufacture of medicines and dietary supplements. *Pharm. Sci.* **2021**, *63*, 36–39. [CrossRef]
6. Sidor, E.; Džugan, M. Drone brood homogenate as a natural remedy for treating health care problem: A scientific and practical approach. *Molecules* **2020**, *25*, 5699. [CrossRef]
7. Sawczuk, R.; Karpińska, J.; Milyk, W. What do we need to know about drone brood homogenate and what is known. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *245*, 111581. [CrossRef] [PubMed]
8. Budnikova, N.W. Biologically active compounds in drones (in Ukrainian). *Pchelovodstvo* **2009**, *6*, 52–53.
9. Barnutiu, L.I.; Marghitaş, L.A.; Dezmirean, D.; Bobiş, O.; Mihai, C.; Pavel, C. Physico-chemical composition of apilarnil (bee drone larvae). *Lucr. Ştiinţifice Seria Zooteh.* **2013**, *59*, 199–202.
10. Kistanova, E.; Zdoroveva, E.; Nevitov, M.; Nosov, A.; Vysokikh, M.; Sukhanova, I.; Vishnyakova, P.; Abadjieva, D.; Ankova, D.; Rashev, P. Drone brood fed supplement impacts on the folliculogenesis in growing gilts. *Vet. Arh.* **2020**, *90*, 583–592. [CrossRef]
11. Isidorov, V.A.; Bakier, S.; Stocki, M. GC-MS investigation of the chemical composition of honeybee drone and queen larva homogenate. *J. Apic. Sci.* **2016**, *60*, 111–120.
12. Pavel, C.I.; Marghitaş, L.A.; Dezmirean, D.S.; Tomos, L.I.; Bonta, V.; Şapcaliu, A.; Buttstedt, A. Comparison between local and commercial royal jelly—Use of antioxidant activity and 10-hydroxy-2-decenoic acid as quality parameter. *J. Apic. Res.* **2014**, *53*, 116–123. [CrossRef]
13. Ramadan, M.F.; Al-Ghamdi, A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *J. Funct. Foods* **2012**, *4*, 39–52. [CrossRef]
14. Olimpia, P.; Al, M.Ä.R.Ş.L.; Dezmirean, D. A study about physicochemical composition of fresh and lyophilized royal jelly. *Zooteh. Biotehnol.* **2008**, *41*, 328–332.
15. Ahmad, S.; Campos, M.G.; Fratini, F.; Altaye, S.Z.; Li, J. New Insights into the Biological and Pharmaceutical Properties of Royal Jelly. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 382. [CrossRef] [PubMed]
16. Kunugi, H.; Ali, A.M. Royal Jelly and Its Components Promote Healthy Aging and Longevity: From Animal Models to Humans. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4662. [CrossRef]

17. Wang, Y.; Ma, L.; Zhang, W.; Cui, X.; Wang, H.; Xu, B. Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **2016**, *47*, 48–56. [[CrossRef](#)]
18. Bałkańska, R.; Marghitas, L.-A.; Pavel, C.I. Antioxidant Activity and Total Polyphenol Content of Royal Jelly from Bulgaria. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2017**, *6*, 578–585. [[CrossRef](#)]
19. Pasupuleti, V.R.; Sammugam, L.; Ramesh, N.; Gan, S.H. Honey, Propolis and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2017**, *2017*, 1259510. [[CrossRef](#)]
20. Park, M.J.; Kim, B.Y.; Deng, Y.; Park, H.G.; Choi, Y.S.; Lee, K.S.; Jin, B.R. Antioxidant capacity of major royal jelly proteins of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *J. Asia Pac. Entomol.* **2020**, *23*, 445–448. [[CrossRef](#)]
21. Mandla, R.; Kumar, N.R. Comparison of carbohydrates in the worker, drone and queen brood food of *Apis mellifera* during spring. *J. Glob. Biosci.* **2016**, *5*, 3765–3768.
22. Mitrofanov, D.V.; Vakhonina, E.A.; Budnikova, N.V. Reducing agents of drone brood products supplemented by royal jelly, propolis and chitosan derivatives. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2021**, *624*, 012146. [[CrossRef](#)]
23. Džugan, M.; Tomczyk, M.; Sowa, P.; Grabek-Lejko, D. Antioxidant activity as biomarker of honey variety. *Molecules* **2018**, *23*, 2069. [[CrossRef](#)]
24. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [[CrossRef](#)]
25. Biju, J.; Reddy, V.; Sulaiman, C.T. Total Phenolics and Flavonoids in Selected *Justicia* Species. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2013**, *2*, 51–52.
26. Koll, K.; Reich, E.; Blatter, A.; Veit, M. Validation of standardized high performance thin—Layer chromatographic methods for quality control and stability testing of herbals. *J. AOAC Int.* **2003**, *83*, 909–915. [[CrossRef](#)]
27. Hosu, A.; Danciu, C.; Cimpoiu, C. Validated HPTLC fingerprinting and antioxidant activity evaluation of twenty-seven Romanian red wines. *J. Food Compos. Anal.* **2015**, *41*, 174–180. [[CrossRef](#)]
28. Stanek, N.; Jasicka-Misiak, I. HPTLC Phenolic Profiles as Useful Tools for the Authentication of Honey. *Food Anal. Methods* **2018**, *11*, 2979–2989. [[CrossRef](#)]
29. Guzelmeric, E.; Ristivojević, P.; Trifković, J.; Dastan, T.; Yilmaz, O.; Cengiz, O.; Yesilada, E. Authentication of Turkish propolis through HPTLC fingerprints combined with multivariate analysis and palynological data and their comparative antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.* **2018**, *87*, 23–32. [[CrossRef](#)]
30. Lopez-Gutierrez, N.; Aguilera-Luiz, M.; Romero-Gonzalez, R.; Martinez Vidal, J.L.; Garrido Frenich, A. Fast analysis of polyphenols in royal jelly products using automated TurboFlow™ liquid chromatography-Orbitrap high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2014**, *973*, 17–28. [[CrossRef](#)]
31. Shanaida, M.; Jasicka-Misiak, I.; Makowicz, E.; Stanek, N.; Shanaida, V.; Wieczorek, P. Development of high-performance thin layer chromatography method for identification of phenolic compounds and quantification of rosmarinic acid content in some species of the Lamiaceae family. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* **2020**, *12*, 139–145. [[CrossRef](#)]
32. Silva-Espinoza, M.A.; Ayed, C.; Foster, T.; Del Mar Camacho, M.; Martínez-Navarrete, N. The impact of freeze-drying conditions on the physico-chemical properties and bioactive compounds of a freeze-dried orange puree. *Foods* **2020**, *9*, 32. [[CrossRef](#)]
33. Tucak, Z.; Periškić, M.; Bešlo, D.; Tucak, I. Influence of the beehive type on the quality of honey. *Coll. Antropol.* **2004**, *28*, 463–467.
34. Simone-Finstrom, M.; Li-Byarlay, H.; Huang, M.H.; Strand, M.K.; Rueppell, O.; Tarry, D.R. Migratory management and environmental conditions affect lifespan and oxidative stress in honey bees. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–10. [[CrossRef](#)]
35. Silici, S. Chemical Content and Bioactive Properties of Drone Larvae (*Apilarnil*). *Mellifera* **2019**, *19*, 14–22.
36. Lazaryan, D.S.; Sotnikova, E.M.; Ertushenko, N.S. Standardization of bee bread homogenate composition. *Pharm. Chem. J.* **2003**, *37*, 614–616. [[CrossRef](#)]
37. Ghosh, S.; Sohn, H.Y.; Pyo, S.J.; Jensen, A.B.; Meyer-Rochow, V.B.; Jung, C. Nutritional composition of *Apis mellifera* Drones from Korea and Denmark as a potential sustainable alternative food source: Comparison between developmental stages. *Foods* **2020**, *9*, 389. [[CrossRef](#)]
38. Prikhodko, A.; Yankina, O.; Kim, N.; Koltun, G.; Skolov, A. Chemical composition of the far eastern homogenate of drone brood. *E3S Web Conf.* **2020**, *203*, 04015. [[CrossRef](#)]
39. Mojzer, E.B.; Hrnčič, M.K.; Škerget, M.; Knez, Z.; Bren, U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* **2016**, *21*, 901. [[CrossRef](#)]
40. Liang, N.; Kitts, D.D. Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanisms of action. *Molecules* **2014**, *19*, 19180–19208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Stagos, D.; Souliotiis, N.; Tsadila, C.; Papaeconomou, S.; Arvanitis, C.; Ntontos, A.; Karkanta, F.; Adamou-Androulaki, S.; Petrotos, K.; Spandidos, D.A.; et al. Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. *J. Mol. Med.* **2018**, *42*, 726–734. [[CrossRef](#)]
42. Zou, T.B.; He, T.P.; Li, H.B.; Tang, H.W.; Xia, E.Q. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules* **2016**, *21*, 72. [[CrossRef](#)]
43. Ding, X.; Kong, X.; Chen, Y.; Zhang, C.; Hua, Y.; Li, X. Selective extraction and antioxidant properties of thiol-containing peptides in soy glycinine hydrolysates. *Molecules* **2018**, *23*, 1909. [[CrossRef](#)]
44. Arts, M.J.; Haenen, G.R.; Voss, H.P.; Bast, A. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *42*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Bakchiche, B.; Habati, M.; Benmebarek, A.; Gherib, A. Total phenolic, flavonoid contents and antioxidant activities of honey and propolis collected from the region of Laghout (South of Algeria). *World News Nat. Sci. Int. Scientific J.* **2017**, *11*, 91–97.
46. Kelly, E.H.; Anthony, R.T.; Dennis, J.B. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 572–584.
47. Korany, M.A.; Moneeb, M.S.; Asaad, A.M.; El-Sebakhy, N.; El-Bana, A.A. A validated stability- indicating HPTLC assay for determination of 10-hydroxy-2-decenoic acid content in royal jelly products using robust regression methods. *J. Chromatogr. Sci.* **2020**, *58*, 520–534. [[CrossRef](#)]
48. Islam, M.K.; Sostanic, T.; Lim, L.Y.; Hammer, K.; Locher, C. Sugar profiling of honeys for authentication and detection of adulterants using high- performance thin layer chromatography. *Molecules* **2020**, *25*, 5289. [[CrossRef](#)]
49. Mosić, M.; Trifković, J.; Vovk, I.; Gasić, V.; Tesić, Z.; Sikoparija, B.; Milojković-Opšenica, D. Phenolic composition influences the health promoting potential of bee- pollen. *Bioelements* **2019**, *9*, 783. [[CrossRef](#)]
50. Kumar, S.; Pandey, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 162750. [[CrossRef](#)]
51. Rha, C.S.; Jeong, H.W.; Park, S.; Lee, S.; Jung, Y.S.; Kim, D.O. Antioxidative, Anti-Inflammatory, and Anticancer Effects of Purified Flavonol Glycosides and Aglycones in Green Tea. *Antioxidants* **2019**, *8*, 278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Table S1. Correlation matrix for frozen and freeze-dried drone brood homogenate.

		DPPH		ABTS		FRAP		TPC		TFC	
		Frozen	Freeze-dried	Frozen	Freeze-dried	Frozen	Freeze-dried	Frozen	Freeze-dried	Frozen	Freeze-dried
DPPH	Frozen	1									
	Freeze-dried	0.824*	1								
ABTS	Frozen	-0.828	-0.760	1							
	Freeze-dried	-0.833	-0.828	0.833*	1						
FRAP	Frozen	0.914*	0.876*	-0.700	-0.714	1					
	Freeze-dried	0.865*	0.814*	-0.714	0.700*	0.909*	1				
TPC	Frozen	0.929*	0.892*	-0.840	-0.817	0.883*	0.919*	1			
	Freeze-dried	0.871*	0.929*	-0.762	0.840*	0.917*	0.883*	0.935*	1		
TFC	Frozen	0.838*	0.911*	-0.773	-0.734	0.882*	0.962*	0.883*	0.908*	1	
	Freeze-dried	0.823*	0.838*	-0.672	0.773*	0.717*	0.882*	0.749*	0.883*	0.799*	1

* – Correlation coefficient statistically significant ($p < 0.05$).

Table S2. Characterization of chromatographic bands for reference standards, color and intensity of band.

Standard	R_f	UV₃₆₆ color	DPPH derivatization intensity
<i>p</i> -coumaric acid	0.41	blue	++
apigenin-7-glucoside	0.05	yellow	-
ferulic acid	0.42	blue	+++
naringenin	0.52	yellow	+++
apigenin	0.43	yellow	+++
chrysin	0.63	pale blue	++

Bands color: + slightly intense; ++ medium intensive; +++ very intense.

Table S3. Characterization of chromatographic bands for extracts of drone brood homogenates, color and intensity of band in UV₃₆₆ and after derivatization.

Band number			1	2	3	4	5	6
R _f			0.09	0.22	0.30	0.33	0.45	0.80
UV ₃₆₆ color			blue	blue	pale yellow	pale blue	yellow	blue
UV ₃₆₆ intensity	I apiary	7- day-old	+++	++	+	+	++	++
		11- day-old	+++	+	+	+	++	+
		14- day-old	++	+	+	-	-	++
	II apiary	7- day-old	+++	++	++	+	++	++
		11- day-old	+++	++	++	+++	++	+
		14- day-old	+++	++	+++	+++	+++	++
	III apiary	7- day-old	+++	++	++	+++	++	+
		11- day-old	++	+	++	++	-	+
		14- day-old	++	+	++	++	-	+
DPPH derivatization intensity	I apiary	7- day-old	++	+	++	-	++	-
		11- day-old	++	+	++	-	+	-
		14- day-old	++	+	+++	-	+	-
	II apiary	7- day-old	+++	+	+	++	+++	++
		11- day-old	++	+	+	++	+++	+
		14- day-old	++	+	+	+++	+++	+
	III apiary	7- day-old	+++	+	+	+++	+++	++
		11- day-old	++	+	+	+	++	+
		14- day-old	++	+	+++	+	+	-
Identification			phenolic acid	phenolic acid	flavonoid	?	apigenin	?

Bands color: + slightly intense; ++ medium intensive; +++ very intense.

Załącznik nr 1 do uchwały nr 118/07/2022

Rady Naukowej Kolegium Nauk

Przyrodniczych dnia 12 lipca 2022 r.

Rzeszów, dnia 6.04.2023r.

Imię i nazwisko mgr inż. Ewelina Sidor

Jednostka Instytut Technologii Żywności i Żywienia,

Zakład Chemii i Toksykologii Żywności

Promotor prof. dr hab. inż. Małgorzata Dżugan

Promotor pomocniczy dr inż. Monika Tomczyk

OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, oświadczam niniejszym, że wkład mojej pracy naukowej (w ramach dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia), a tym samym pracy pozostałych współautorów w opublikowaniu poniższych artykułów, które zamierzam przedstawić jako własną dysertację doktorską jest następujący:

IV. Ewelina Sidor, Monika Tomczyk, Michał Miłek, Małgorzata Dżugan. *The effect of storage time on the antioxidant activity and polyphenolic profile of frozen and lyophilized drone brood fixed in honey*. Food. Science. Technology. Quality 2022, 29 (2), 45-56.

- koncepcja badań – ustalenie wraz z promotorem formy dodatku i procentowego udziału czerwiu trutowego w gotowym produkcie, zebranie miodu z podkarpackiej pasieki, wprowadzanie dodatków, kremowanie
- wykonanie badań – analiza aktywności antyoksydacyjnej (DPPH, FRAP) miodów z czerwem trutowym po 3, 6 i 9 miesiącach przechowywania, przygotowanie próbek do rozdzielenia techniką HPTLC i wykonanie rozdzielenia chromatograficznego związków polifenolowych
- opis wyników, zestawienie w formie wykresów potencjału antyoksydacyjnego mierzonego metodami DPPH i FRAP
- dyskusja z innymi pracami dostępnymi w formie elektronicznej
- przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu
- obowiązki autora korespondencyjnego - administrowanie postępów podczas publikacji artykułu i kontakt z Edytorem.

..... Ewelina Sidor

Podpis

Oświadczenia współautorów

1. dr inż. Monika Tomczyk

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Ewelinę Sidor udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- opis i dyskusja wyników dla całkowitej zawartości związków polifenolowych
- analiza i opracowanie wyników - obróbka statystyczna i graficzna

.....

.....

Podpis

2. dr inż. Michał Miłek

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Ewelinę Sidor udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- przygotowanie ekstraktów miodów wzbogaconych i wykonanie profilu polifenolowego metodą HPTLC,
- analiza i opracowanie uzyskanych chromatogramów

.....

.....

Podpis

3. prof. dr hab. inż. Małgorzata Dżugan
Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Ewelinę Sidor udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- koncepcja badań – ustalenie formy i procentowego udziału dodatku czerwiu trutowego wprowadzanego do miodu
- ocena postępów podczas pisania pracy i udzielanie dalszych wskazówek mających na celu udoskonalenie manuskryptu.
- udział w opracowaniu dyskusji wyników i ostateczna korekta manuskryptu


.....
Podpis

EWELINA SIDOR, MONIKA TOMCZYK, MICHAŁ MIŁEK,
MAŁGORZATA DŻUGAN

THE EFFECT OF STORAGE TIME ON THE ANTIOXIDANT ACTIVITY AND POLYPHENOLIC PROFILE OF FROZEN AND LYOPHILIZED DRONE BROOD FIXED IN HONEY

Summary

Background. The purpose of the study was to evaluate the effect of drone brood fixation in rape honey and to analyze changes in its antioxidant activity during storage. The fixation was carried out for frozen and lyophilized drone brood, which were mixed with honey in various proportions (1, 2, and 4 % w/w). The antioxidant activity (DPPH and FRAP methods) and the total content of polyphenolic compounds (TPC) after 3, 6, and 9 months of storage were analyzed. After 9 months of storage, the polyphenolic profile (HPTLC method) and physicochemical parameters of samples were assessed.

Results and conclusion. The addition of drone brood to honey increased the antioxidant activity of the final product considerably (by 33 to 110 %), while only slightly affected the physicochemical parameters (conductivity and a diastase number) compared to control honey. Moreover, honey with the addition of drone brood still continued to meet the requirements for honey standard. The polyphenol profile obtained by HPTLC method for honey with the addition of drone brood was enriched mainly with ellagic and ferulic acids compared to control honey. It was found that fixing the drone brood in honey allows to maintain its antioxidant properties for 6 months, whereas a significant decrease in reducing power (FRAP) and polyphenolic content (TPC) during prolonged storage were observed (from 8 to 26 %). Due to the fact that lower losses were observed for the addition of frozen than for lyophilized drone brood after 9 months of storage, preserving the frozen brood in honey (up to 5 % w/w) can be recommended as an effective and inexpensive method available in apiary conditions.

Key words: drone brood, treatment, honey, antioxidant activity, polyphenolic profile

Introduction

Drone brood homogenate is a bee product obtained from drone larvae collected from drone cells in a honeycomb at various stages of development. In the form of a

Mgr inż. E. Sidor, ORCID: 0000-0002-3954-4940, dr inż. M. Tomczyk, ORCID: 0000-0002-4010-4352, dr inż. M. Miłek, ORCID: 0000-0001-9312-2506, dr hab. M. Dżugan, prof. UR, ORCID: 0000-0003-1601-6296, Zakład Chemii i Toksykologii Żywności, Instytut Technologii Żywności i Żywnienia, Kolegium Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Rzeszowski, ul. Ćwiklińskiej 1a, 35-601 Rzeszów; Kontakt: ewelina.sidor.dokt@gmail.com

homogenate, because of its similar chemical properties, it is considered to be the male equivalent of royal jelly. It is commonly used as Apilarnil, which is obtained from drone brood subjected to homogenization, then frozen at $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ and fixed by lyophilization to preserve its biological properties [4].

Drone brood, as a nutrient-rich little-known beekeeping product has many beneficial healing properties. It is a valuable source of protein (13.28 %) and minerals (e.g. phosphorus, sodium, sulfur, magnesium, calcium), but also contains phenols (ellagic acid, chlorogenic acid) and steroid hormones (testosterone, progesterone, estradiol) [16]. Due to its low acquisition cost and effectiveness, it was used as a remedy for various diseases. Some of the biological and therapeutic effects of drone brood have been confirmed in *in vitro* laboratory studies [13, 16].

It is known that drone brood loses its biological activity in a very short time, so it is important to fix it as quickly as possible. The simplest and cheapest method is freezing (up to 6 days at $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ or up to 10 months at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$). Drone brood can be frozen in liquid nitrogen ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) or lyophilized (shelf life up to 2 years). However, drone brood can be deposited on a stable absorbent such as honey. For this purpose, a previously prepared homogenate of drone brood is added to honey in the amount of up to $1 \div 5\%$ of the final volume. The storage of the final product at room temperature allows its properties to be retained for 6 months [5].

The effect of honey variety as a fixing agent has not been studied in detail. However, rape honey is best suited for this purpose. It is one of the best-known varieties in Poland due to the earliest harvesting time, a low price, and easy availability. In a liquid form, it has a light color and crystallizes the fastest among all honey varieties found in Poland ($3 \div 7$ days). After crystallization, it turns white or changes its color to creamy. Rape honey contains essential oils, tannins, bitter compounds, flavonoids (mainly quercetin, kaempferol, apigenin) [23]. This honey type nourishes and regenerates an exhausted organism [12]. Recently, it has been promoted to replace unhealthy sugar with honey, which cannot be overdosed because of its sweet taste and quick satiation with sweet taste.

The aim of the study was to fix drone brood (frozen or lyophilized) in rape honey and to analyze changes in the antioxidant activity of obtained mixtures during storage.

Materials and methods

Chemicals

Chemicals [2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine], reagents (Folin-Ciocalteu reagent), were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Solvents and acids (ethyl alcohol, ethyl acetate, formic acid, acetic acid) were purchased from Chempur (Piekary

Śląskie, Poland) and reagents for HPTLC visualization (natural product reagent, PEG 400) were obtained from Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany).

Material Collection

The drone brood was collected from an apiary in the south-eastern part of Poland in the June 2020 season. The drone brood of the *Apis mellifera carnica* breed families were selected by hand from a drone frame, immediately sealed in sterile containers, and transferred to the laboratory. The samples were homogenized using a tissue homogenizer (TH 02, Omni International, Kennesaw, GA, USA) with 7 mm Omni Tips™ plastic tips. The material was then frozen at -18°C or lyophilized (using Alpha 1–2, LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Germany). Rape honey was purchased from a local apiary located in the Podkarpackie Province in the 2020 beekeeping season.

As a method of drone brood fixation, both the frozen (F) or lyophilized (L) drone brood were introduced to honey during creaming. Liquefied rape honey (100 g) was weighted in a glass jar (200 cm³), inoculated with crystallized honey (99:1) and mixed with a kitchen mixer for 60 s, four times a day to start the crystallization process. Six honey samples were creamed. Subsequently, frozen drone brood was added to honey in increasing amounts of 1, 2, and 4 % (w/w). For lyophilized drone brood, the addition was recalculated taking into account a loss of water during lyophilization as 0.3, 0.6 and 1.2 % w/w, but for the better understanding, it was marked as the same as the dose of frozen brood dose (corresponded value 1, 2 and 4 % w/w). The whole mixture was mixed again with the kitchen mixer for 60 s. Samples prepared in such a manner were stored in a refrigerator at 4 °C for three days and mixed two times a day to obtain homogeneous consistency. After complete crystallization, the honeys were stored at 21 ± 2 °C without exposure to sunlight for 3, 6, 9 months until analyses.

DPPH Test

The inhibition of the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical was measured by following the assay procedure described by Dżugan et al. [2], with minor modifications. The reduction of DPPH radicals was calculated using the following t AA % = $[(A_0 - A_s)/A_0] \times 100$, where A₀ is the absorbance of the control and A_s is the absorbance of the tested samples and expressed as μmol of Trolox (TE) equivalents per 100 g of honey (μmol/100 g) based on a calibration curve ($y = 15.553x$, $r^2 = 0.9970$), prepared for Trolox in the range of 25-300 nmol/cm³.

FRAP Assay

The FRAP (ferric ion reducing antioxidant parameter) assay was carried out according to Dżugan et al. [2]. The results were expressed as μmol of Trolox (TE) equiv-

alents per 100 g of honey ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$) based on a calibration curve ($y = 0.152x$, $r^2 = 0.9998$), prepared for 0.1 mmol Trolox in the range of 25-300 nmol/cm³.

Total Phenolic Content Determination (TPC)

The total phenolic content was determined using a Folin-Ciocalteu reagent, according to Dżugan et al. [2], with minor modifications. The phenolic content expressed as mg of gallic acid (GAE) equivalents per 100 g of honey (mg GAE/100 g) was calculated based on a calibration curve prepared for gallic acid in the range of 0 ÷ 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($y = 0.336x$, $r^2 = 0.9914$).

Polyphenolic profile using HPTLC chromatography

The polyphenolic profiles for honeys were performed on HPTLC Silica Gel 60 F₂₅₄ plate (20 × 10 cm) purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The samples for an analysis were prepared by making a 20 % solution of honeys in water acidified with HCl (pH = 2). Subsequently, the solutions were passed through the C-18 Sep-Pak cartridges (Waters, Milford, USA) retaining phenolic compounds. Ballast compounds were rinsed with 10 mL of acidified water and finally polyphenols were rinsed with 2.5 mL of methanol. Five μL of such prepared honey samples were applied to the HPTLC Silica Gel 60 F₂₅₄ plate as 7 mm bands from the lower edge of a plate, at the rate of 100 nL/s, using a semi-automated HPTLC application device (Linomat 5, CAMAG, Muttenz, Switzerland). Chromatographic separation was performed in a chromatographic tank saturated for 20 min with the mobile phase (ethyl acetate: water: formic acid: acetic acid; 15:2:1:1) and developed to a distance of 70 mm. The results obtained were documented using an HPTLC imaging device (TLC Visualizer, CAMAG) at 366 nm. Additionally, the plate was derivatized using an automated TLC plate derivatizer (CAMAG Derivatizer) with Natural Product Reagent (diphenylboric acid β -aminoethyl ester complex) and in the second step with an alcoholic PEG 400 solution. The chromatographic image obtained was analyzed using HPTLC software (Vision CATS, CAMAG). The profile of polyphenolic compounds of honey with the addition of drone brood was analyzed in comparison to control honey and drone brood fingerprints in terms of the pattern of bands, their color and intensity. Single phenolic compounds was identified based on R_f values determined for standard substances (ellagic acid, ferulic acid, chlorogenic acid, quercetin, apigenin) separated under the same conditions (not shown on the chromatogram).

Physicochemical parameters determination

The water content, active acidity and free acidity, conductivity and diastase number were determined for all tested samples strictly as described in our earlier paper [15], in accordance with the legal requirements for honey [11].

Statistical analysis

All calculations were made in triplicate. Three-way analysis of variance followed by HSD Tukey's test ($p < 0.05$) was applied to find significant differences in antioxidant activity regarding the used drone brood addition value, the time of storage and the form of added drone brood. The Student's t-test was used to check whether the differences between the control sample and other means are statistically significant. Correlation coefficients (r Pearson) were calculated. All calculations were performed using Statistica 13.3 software (StatSoft, Tulsa, USA).

Results and discussion

Changes in antioxidant activity and total phenolic content of drone brood fixed in rape honey during storage

Rape honey (control) showed antioxidant activity measured using a DPPH method at the level of $3.1 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$, which gave almost 10 % of the ability to scavenge free radicals (Fig. 1a). The addition of 1 % of frozen drone brood to honey significantly increased the antiradical capacity by 64.5 %. However, the addition of 2 % of drone brood did not have a direct effect on a double increase in the antiradical activity. The highest increase in the analyzed parameter, compared to control honey, was demonstrated for the highest addition of frozen drone brood (an increase of 77.4 %).

The storage time did not influence the activity of the tested honeys significantly. However, after 9 months of the storage of honey, a significant decrease in antioxidant activity was found in all the analyzed samples. The ability of rape honey (control) to scavenge free radicals increased by 6.45 %, which is characteristic of stored honey (Maillard reaction) [21]. On the other hand, as regards the honeys to which drone brood was added, a decrease in antioxidant activity was found ($9.3 \div 36.95 \%$). The greatest decrease was found for honey with a 4 % addition of frozen drone brood. Despite a decrease in activity after 9 months of storage, the honey retained a higher activity compared to the control honey.

A similar relationship was found for the results of ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) (Fig. 1b), which was confirmed by a correlation among the results after 3 months of storage ($r = 0.532$). However, the addition of lyophilized drone brood enriched honey with bioactive compounds to a lower extent, but the highest increase compared to the control was found for the 4 % addition of frozen brood (60.53 %). The storage of drone brood fixed in honey for 9 months decreased the ability to reduce ferric ions in all samples significantly. Compared to the honeys stored for 6 months, the activity of rape honey decreased by 17.31 %, while in the case of honeys with brood addition, it ranged from 2.84 to 32.95 %.

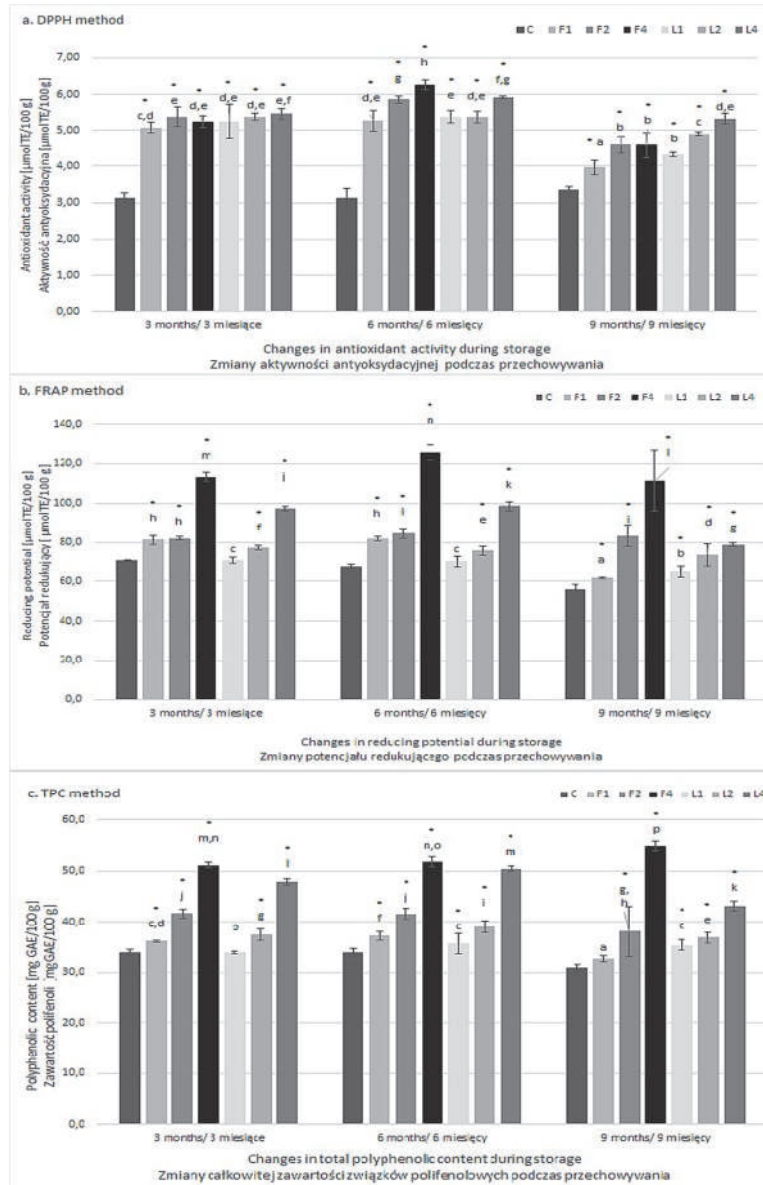


Fig. 1. Changes in the antioxidant properties of drone brood fixed in honey compared to control rape honey measured using the DPPH method (a), the FRAP method (b), and as total phenolic content (c); (n=3)

Ryc. 1. Zmiany właściwości przeciwutleniających czerwia trutowego utrwalonego w miodzie w porównaniu z kontrolnym miodem rzepakowym mierzone metodą DPPH (a), metodą FRAP (b) oraz jako całkowita zawartość polifenoli (c); (n=3)

Explanatory notes / objaśnienia: a, b, c, d, e, f, g - means marked with different letters differ significantly / średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie ($p < 0.05$); * significant differences compared to control honey / istotnie różne w porównaniu do próby kontrolnej ($p < 0.05$)

The synergistic effect of the mixture of various bee products with honey has been already reported. Habryka et al. [3] enriched honey with 25 % bee pollen and achieved eight-and-a-half times higher DPPH activity of the finished product compared to control honey. However, the 5 % addition contributed to a two-and-a-half-fold increase in activity. The authors [3] obtained a similar effect by enriching honey with propolis at various concentrations (0.1 ÷ 1 %). Socha et al. [17] analyzed the effect of adding bee bread to honey. A FRAP analysis showed that after the addition 20 % of bee bread to honey, the reducing ability increased 10 times, which was statistically significant.

The total polyphenol content in the rape honey was 33.9 mg GAE/100 g (Fig. 1c). The highest increase was recorded for the greatest addition of frozen and lyophilized drone brood by 51.03 and 41.29 %, respectively. Furthermore, the addition of drone brood increased the content of phenolic compounds significantly, except for the addition of 1 % brood lyophilisate compared to control honey. After 6 months of storage, the content of polyphenolic compounds in the enriched honey increased on average by 3-5 %, which was statistically significant and strongly correlated with the FRAP results ($r = 0.925$). Moreover, the influence of the form of the additive, the amount of the additive and the storage time on changes in the antioxidant potential and the content of polyphenols was found. All interactions were statistically significant ($p < 0.05$). The 9-month storage of drone brood fixed in honey resulted in a decrease in the content of polyphenolic compounds by 14.29 % for honey with a 4 % addition of lyophilized drone brood. Habryka et al. [3] enriched honey with 5 % bee pollen and showed a significant increase in the total content of polyphenolic compounds. Majewska and Trzaneek [8] obtained similar results.

The comparison of the HPTLC polyphenolic profiles of drone brood fixed in rape honey after 9 months of storage

The comparison of polyphenolic profiles of drone brood fixed in rape honey was provided in Fig. 2.

The visualization of drone brood extract (DB) at 366 nm shows a phenolic profile ($R_f = 0.12, 0.20, 0.25, 0.31, 0.45, 0.84, 0.91$), which can be considered unique because the bands are visually different in color (light blue, blue). Additionally, chlorogenic acid ($R_f = 0.03$) was identified at the start line as the light blue band. Rape honey showed a different phenolic profile than drone brood. For honey, the most intense bands were found at R_f (0.12, 0.21, 0.31). This fingerprint was dominated by brown ($R_f = 0.05 ÷ 0.25$), and light yellow bands (R_f above 0.90). In addition, the presence of light yellow and light blue bands was found. Some bands that were barely visible in the control honey showed higher intensity in honey with the addition of drone brood at $R_f = 0.31, 0.12$ (blue bands) and 0.95 (yellow band) identified as apigenin. Increasing the

intensity and visibility of the bands, as well as increasing the addition share, proves that the content of phenolic compounds in honey becomes higher with the addition of drone brood. The results obtained were in line with the Stanek and Jasicka-Misiak's results [18], who compared the phenolic profile of nectar honeys. They showed dominant bands of yellow, light blue, blue and black, among which they identified the presence of p-coumaric acid, chlorogenic acid and myricetin in nectar honeys. However, Tomczyk et al. [19] analyzed the phenolic profile of Polish honeys, showing orange, blue, yellow, and green bands in rape honey. The composition of polyphenols in drone brood was similar to that in the previous studies [14, 15]. Blue bands dominated in the drone brood homogenate chromatogram, which proves the presence of ferulic acid (Rf

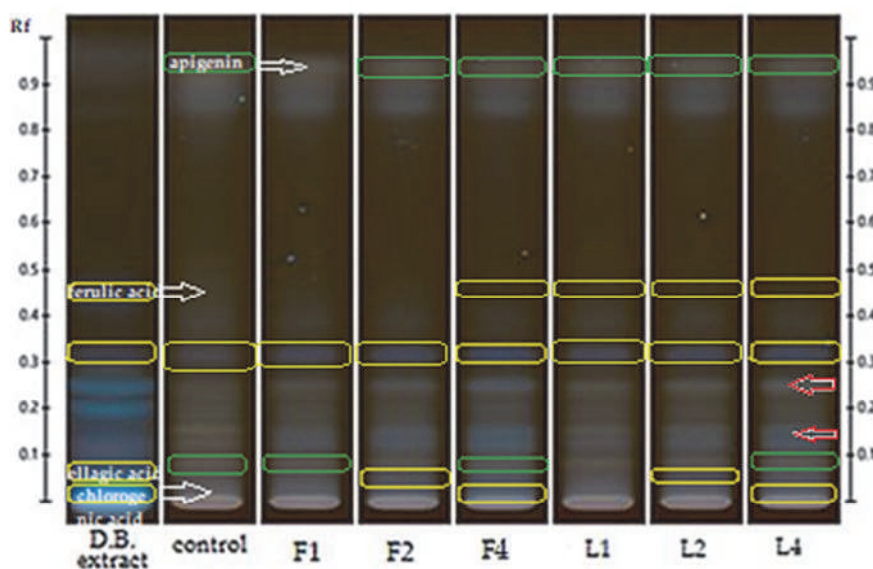


Fig. 2. Polyphenolic profiles (using the HPTLC method) after 9 months of storage of frozen (F1, F2, and F4) and lyophilized (L1, L 2 and L 4) drone brood fixed in honey. DB - drone brood extract and control - rape honey were used for the comparison.

Rys. 2. Profile polifenolowe (metodą HPTLC) po 9 miesiącach przechowywania zamrożonego (F1, F2 i F4) i liofilizowanego (L1, L 2 i L 4) czerwiu trutowego utrwalonego w miodzie. Dla porównania użyto DB - ekstrakt z czerwia trutowego i kontrolny miód rzepakowy.

Explanatory notes / objaśnienia:

Selected compounds which migrated from the drone brood extract to honey are marked in yellow, compounds originated from rape honey are marked in green. The red arrow indicates the small amount of polyphenols present in honey, which the content of which was increased by drone brood addition (bands which were intensified).

Na żółto zaznaczono wybrane związki migrujące z ekstraktu czerwia trutowego do miodu, na zielono zaznaczono związki pochodzące z miodu rzepakowego. Czerwona strzałka wskazuje polifenole obecne w miodzie w niewielkiej ilości, których zawartość została zwiększona przez dodanie czerwia trutowego (prążki, które zostały zintensyfikowane).

= 0.48) and ellagic acid ($R_f = 0.08$) in the tested material. Moreover, apigenin as yellow band was identified [15]. Based on the HPTLC results, the beneficial effect of drone brood additive on polyphenolic profile of rape honey was shown, the higher share of drone brood, the more polyphenols were observed.

Physicochemical parameters and organoleptic evaluation of enriched honeys after 9 months of storage under legal regulations for honey

After 9 months of storage, the organoleptic evaluation of the honeys was carried out. During the evaluation of honeys with frozen drone brood, it was found that their taste and smell corresponded to the typical characteristics of rape honey and no foreign ones were found. Only the color of the honey with 4 % addition was slightly darker and the consistency more fluid, however, these observations did not reduce the overall quality of the honey. The honeys enriched with lyophilized drone brood behaved similarly. In this case, their taste and smell did not differ from that of the control honey. The color of the honey was very similar to that of the control honey, also with the 4 % additive. The honey enriched with lyophilized drone brood retained a more stable consistency compared to the addition of frozen brood due to low water content. In addition, it was observed that the highest addition stabilized the consistency and was the most stable among all of the honeys being evaluated.

Bee honey is obtained according to generally accepted beekeeping practice and is always subjected to quality control before being placed on the market. The physicochemical parameters, thanks to which the quality of honey is controlled based on a laboratory analysis, include, among other things, water content, electrical conductivity, acidity, pH, and diastase number. A good quality of the rape honey was confirmed, which was in line with the findings of other authors for Polish [7, 10, 19] and European [1, 6, 22] rape honey. The analysis of physicochemical parameters after 9 months of the storage of the honeys did not show deviations from the norm for nectar honeys [11]. The addition of 4 % of frozen drone brood did not exceed allowed water content. However, the value was significantly different from the control honey. Meanwhile, a beneficial increase in acidity, conductivity and diastase number was observed for the enriched honey, resulting from native acidity, high bioelement content, and diastatic activity of raw drone brood [15]. However, the values observed were still within the legal limits for honey quality standard.

Developing new products and introducing them to the market is extremely difficult and should take into account market requirements and consumer preferences. Most importantly, a new product and its ingredients should neither be hazardous to nor mislead the consumer [9]. Due to the hormonal activity of drone brood, detailed studies should be performed to confirm safe consumption and the maximum daily dose should be established before introducing it as a dietary product.

Table 1. Physicochemical properties of honey enriched with drone brood after 9 months of storage (n=3).

Tabela 1. Właściwości fizykochemiczne miodu wzbogaconego czerwiem trutowym po 9 miesiącach przechowywania (n=3).

Sample / Próbką	Water content Zawartość wody [%]	pH	Acidity Kwasowość [mval/kg]	Conductivity Przewodność właściwa [mS/cm]	Diastase number Liczba diastazy
Control	17.00	4.70	13.15	0.215	11.07
F 1	17.20	4.52	16.10*	0.225	13.69*
F 2	17.30*	4.59	19.60*	0.249*	17.16*
F 4	19.70*	4.45	24.80*	0.256*	17.50*
L 1	17.15	4.63	15.90*	0.216	13.53*
L 2	17.00	4.59	17.20*	0.225	14.00*
L 4	17.00	4.56	22.70*	0.244*	14.96*
Standard requirements PN-88/A-77626	<20	-	<50	0.2-0.8	>8

Explanatory notes / Objasnienia:

*significant differences compared to control honey / istotnie różnie w porównaniu do miodem kontrolnym (p < 0.05)

Conclusions

1. The addition of drone brood to rape honey significantly increased its antioxidant activity and enriched polyphenolic profile in a dose-dependent manner.
2. The use of frozen drone brood in the highest dose was more beneficial than the lyophilized additive, for this product less changes in antioxidant activity were observed during prolonged storage.
3. The use of honey to fix the drone brood did not change significantly its physicochemical parameters, which still meet the requirements of honey quality standards.
4. Fixing frozen drone brood in honey seems to be the most applicable method under apiary conditions.

References

- [1] Chakir A., Romane A., Marcazzan G.L., Ferrazzi P.: Physicochemical properties of some honeys produced from different plants in Morocco. Arab. J. Chem., 2016, 9, 946–954.
- [2] Dżugan M., Tomczyk M., Sowa P., Grabek-Lejko D.: Antioxidant Activity as Biomarker of Honey Variety. Molecules, 2018, 23 (8), #2069.
- [3] Habryka C., Socha R., Juszcak L.: Effect of bee pollen addition on the polyphenol content, antioxidant activity, and quality parameters of honey. Antioxidants, 2021, 10, #810.
- [4] Kędzia B., Holderna-Kędzia E.: Mniej znane produkty pszczele. Sądecki Bartnik, Stróże 2017.


- [5] Kryłow W.N., Agafonow A.W., Kriwcow, N.I.: Theory and Methods of Apitherapy; GNU, Moscow 2007, pp. 168–180.
- [6] Laaroussi H., Bouddine T., Bakour M., Ousaaid D., Lyoussi B.: Physicochemical Properties, Mineral Content, Antioxidant Activities, and Microbiological Quality of *Bupleurum spinosum* Gouan Honey from the Middle Atlas in Morocco. *J. Food Qual.*, 2020, # 7609454.
- [7] Majewska E., Derewiaka D., Ciecierska M.: Fizykochemiczne wyróżniki jakości wybranych miódów nektarowych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2015, 440–444.
- [8] Majewska E., Trzaniek, J.: Antioxidant activity of multi-flower honey and other bee products. *Bromatol. Chem. Toksykol.*, 2009, 4, 1089–1094.
- [9] Makala H., Olkiewicz M.: Zasady opracowywania nowych produktów z uwzględnieniem oczekiwania konsumentów. *Żywność: Nauka, Technologia, Jakość*, 2004, 1(38), 120–133.
- [10] Miastkowski K., Bakier S.: Research on the impact of water activity in honey on the process of dehydration. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 2018, 2, 49-53.
- [11] PN-88/A-77626. Miód pszczele. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.
- [12] Ranneh Y., Akim A.M., Hamid H.A., Khazaai H., Fadel A., Zakaria Z.A., Albuja M., Bakar M.F.A.: Honey and its nutritional and anti-inflammatory value. *BMC Complement. Med. Ther.*, 2021, 21, 1-17.
- [13] Sawczuk R., Karpinska J., Miłtyk W.: What do we need to know about drone brood homogenate and what is known. *J. Ethnopharmacol.*, 2019, 245, #111581.
- [14] Sidor E., Miłek M., Tomczyk M., Dżugan M.: Antioxidant Activity of Frozen and Freeze-Dried Drone Brood Homogenate Regarding the Stage of Larval Development. *Antioxidants*, 2021, 10, #639.
- [15] Sidor E., Miłek M., Zaguła G., Bocian A., Dżugan M.: Searching for Differences in Chemical Composition and Biological Activity of Crude Drone Brood and Royal Jelly Useful for Their Authentication. *Foods*, 2021, 10, #2233.
- [16] Sidor E., Dżugan M.: Drone Brood Homogenate as Natural Remedy for Treating Health Care Problem: A Scientific and Practical Approach. *Molecules*, 2020, 25, #5699.
- [17] Socha R., Habryka C., Juszcak, L.: Effect of bee bread additive on content of phenolic compounds and antioxidant activity of honey. *Food. Science. Technology. Quality.*, 2018, 25, 108-119.
- [18] Stanek N., Jasicka-Misiak, I.: HPTLC Phenolic Profiles as Useful Tools for the Authentication of Honey. *Food Anal. Methods*, 2018, 11, 2979-2989.
- [19] Tomczyk M., Miłek M., Sidor E., Kapusta, I., Litwińczuk, W., Puchalski C., Dżugan M.: The Effect of Adding the Leaves and Fruits of *Morus alba* to Rape Honey on Its Antioxidant Properties, Polyphenolic Profile, and Amylase Activity. *Molecules*, 2020, 25, #84.
- [20] Tomczyk M., Tarapatsky M., Dżugan M.: The influence of geographical origin on honey composition studied by Polish and Slovak honeys. *Czech J. Food Sci.*, 2019, 37, 232–238.
- [21] Wilczyńska A.: Zmiany barwy oraz aktywności antyoksydacyjnej miódów podczas przechowywania. *Bromat. Chem. Toksykol.* XLIV, 2013, 945-950.
- [22] Yadata D.: Detection of the Electrical Conductivity and Acidity of Honey from Different Areas of Tepi. *Food Sci. Technol.*, 2014, 2, 59–63.
- [23] Zhang G.Z., Tian, J., Zhang Y.Z., Li S.S., Zheng H.Q., Hu F.L.: Investigation of the maturity evaluation indicator of honey in natural ripening process: The case of rape honey. *Foods*, 2021, 10, # 2882.

**WPLYW CZASU PRZECHOWYWANIA NA WŁAŚCIWOŚCI ANTYOKSYDACYJNE
I PROFIL POLIFENOLOWY MROŻONEGO I LIOFILIZOWANEGO CZERWIU
TRUTOWEGO UTRWALONEGO W MIODZIE**

Streszczenie

Wprowadzenie. Celem pracy była ocena wpływu utrwalenia czerwiu trutowego w miodzie rzepakowym oraz analiza zmian jego aktywności antyoksydacyjnej podczas przechowywania. Utrwalanie przeprowadzono na mrożonym i liofilizowanym czerwiu trutowym, który zmieszano z miodem w różnych proporcjach (1, 2 i 4 % w/w). Analizowano aktywność przeciwutleniającą (metodami DPPH i FRAP) oraz całkowitą zawartość związków polifenolowych (TPC) po 3, 6 i 9 miesiącach przechowywania. Po 9 miesiącach przechowywania oceniono profil polifenolowy (metoda HPTLC) oraz parametry fizykochemiczne.

Wyniki i wnioski. Dodatek czerwiu trutowego do miodu silnie zwiększył aktywność przeciwutleniającą produktu końcowego (o 33 do 110 %), a jedynie nieznacznie wpłynął na parametry fizykochemiczne (przewodność i liczbę diastazową) w porównaniu z miodem kontrolnym. Ponadto miód z dodatkiem czerwiu trutowego nadal spełnia wymagania normy dla miodu. Profil polifenolowy uzyskany metodą HPTLC dla miodu z dodatkiem czerwiu trutowego został wzbogacony głównie o kwas elagowy i ferulowy w porównaniu z miodem kontrolnym. Stwierdzono, że utrwalanie czerwiu trutowego w miodzie pozwala na zachowanie jego właściwości antyoksydacyjnych przez 6 miesięcy, natomiast zaobserwowano znaczne spadki mocy redukującej (FRAP) i zawartości polifenoli (TPC) podczas dłuższego przechowywania (od 8 do 26 %). W przypadku dodatku czerwiu mrożonego, po 9 miesiącach przechowywania obserwowano mniejsze straty niż w przypadku liofilizatu, dlatego przechowywanie mrożonego czerwiu w miodzie (do 5 % m/m) można polecić jako skuteczną i niedrogą metodę dostępną w warunkach pasiecznych.

Słowa kluczowe: czerw trutowy, utrwalanie, miód, aktywność antyoksydacyjna, profil polifenolowy 

Załącznik nr 1 do uchwały nr 118/07/2022
Rady Naukowej Kolegium Nauk
Przyrodniczychz dnia 12 lipca 2022 r.

Rzeszów, dnia ...10.04.2023r.....

Imię i nazwisko mgr inż. Ewelina Sidor
Jednostka Instytut Technologii Żywności i Żywienia,
Zakład Chemii i Toksykologii Żywności
Promotor prof. dr hab. inż. Małgorzata Dżugan
Promotor pomocniczy dr inż. Monika Tomczyk

OŚWIADCZENIE

W związku z przygotowywaniem przeze mnie rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, oświadczam niniejszym, że wkład mojej pracy naukowej (w ramach dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia), a tym samym pracy pozostałych współautorów w opublikowaniu poniższych artykułów, które zamierzam przedstawić jako własną dysertację doktorską jest następujący:

V. Małgorzata Dżugan, Ewelina Sidor, Michał Miłek, Monika Tomczyk. The possibility of using bee drone brood to design novel dietary supplements for apitherapy. Applied Sciences 2023, 13 (8), 4687.

- koncepcja badań – ustalenie wraz z promotorem receptury wytwarzania suplementów diety, formy czerwiu
- walidacja metody prowadzonego trawienia *in vitro*
- wykonanie badań – przeprowadzenie symulowanego trawienia *in vitro* w warunkach laboratoryjnych, analiza aktywności antyoksydacyjnej (FRAP), hormonów (testosteron, estradiol), białka i wapnia; wykonanie rozdziału elektroforetycznego próbek po trawieniu, obróbka, analiza i dyskusja uzyskanych wyników i ich przechowywanie
- przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, doskonalenie według zaleceń promotora
- pełnienie obowiązków autora korespondencyjnego – wysłanie pracy w systemie, kontakt z przydzielonym Edytorem czasopisma

.....Ewelina Sidor.....
Podpis

Oświadczenia współautorów

1. **prof. dr hab. inż. Małgorzata Dżugan**

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Ewelinę Sidor udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- koncepcja badań – ustalenie receptury wytwarzania suplementów diety, formy wapnia organicznego do analiz oraz wysokości dodatku
- walidacja metody symulowanego trawienia *in vitro*
- metodyka – dobór odpowiednich metod analitycznych
- nadzór nad prowadzonymi badaniami, analiza formalna uzyskanych wyników
- udział w przygotowaniu i ostateczna korekta manuskryptu.
- pozyskanie finansowania na opublikowanie artykułu



.....
Podpis

2. **dr inż. Michał Miłek**

Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Ewelinę Sidor udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- wykonanie analiz chromatograficznych HPTLC profilu polifenolowego i aminokwasowego
- opracowanie chromatogramów pod kątem graficznym, dyskusja wyników



.....
Podpis

3. dr inż. Monika Tomczyk
Imię i Nazwisko współautora

Jako współautor akceptuję przedstawiony przez Panią mgr inż. Ewelinę Sidor udział w przygotowaniu powyżej publikacji naukowej, która stanowić będzie część Jej dysertacji doktorskiej. Jednocześnie oświadczam, że wkład mojej pracy naukowej w opublikowaniu powyższego artykułu jest następujący:

- dostosowanie metodyki i udział w przeprowadzeniu symulowanego trawienia *in vitro* w warunkach laboratoryjnych
- analiza całkowitej zawartości związków polifenolowych (TPC), opracowanie i dyskusja uzyskanych wyników
- korekta językowa manuskryptu

.....
Monika Tomczyk
.....
Podpis

Article

The Possibility of Using Bee Drone Brood to Design Novel Dietary Supplements for Apitherapy

Małgorzata Dżugan ¹, Ewelina Sidor ^{1,2,*}, Michał Miłek ¹ and Monika Tomczyk ¹

¹ Department of Chemistry and Food Toxicology, Institute of Food Technology and Nutrition, College of Natural Sciences, University of Rzeszow, 35-601 Rzeszow, Poland

² Doctoral School, University of Rzeszow, 35-959 Rzeszow, Poland

* Correspondence: ewelina.sidor.dokt@gmail.com

Abstract: Drone brood is a little-known bee product, often treated as beekeeping waste or natural varroosis bait. Obtaining drone brood from beehives does not weaken the bee family, which is why this product is used as natural medicine in Eastern European countries. The main objective of this work was to design an innovative dietary supplement containing freeze-dried drone brood (DB) enriched with calcium ions (3:1). As the calcium component, inorganic calcium carbonate (CC) and ground chicken eggshells (ES) were used. Bioaccessibility of hormones, selected nutrients (proteins and amino acids), non-nutritive polyphenols from pure drone brood (DB), and designed supplements (DB + CC, DB + ES) were analyzed using an in vitro gastrointestinal system. It was shown that drone brood components are better bioaccessible from the DB + ES compared to DB + CC and DB capsules. An increase was achieved by up to 93.33%, 21.29%, 105.14%, and 52.34% for testosterone, estradiol, calcium, and polyphenols, respectively. Drone brood proteins were completely digested to free amino acids which was confirmed by SDS-PAGE electrophoresis and high-performance thin layer chromatography (HPTLC). Due to the demonstrated synergistic action of drone brood and the calcium of eggshells, the newly proposed two-ingredient supplement seems to be an efficient treatment to equalize hormonal and calcium deficiency in osteoporosis; however, its application requires further studies.

Keywords: drone brood; testosterone; protein; polyphenols; bioaccessibility



Citation: Dżugan, M.; Sidor, E.; Miłek, M.; Tomczyk, M. The Possibility of Using Bee Drone Brood to Design Novel Dietary Supplements for Apitherapy. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 4687. <https://doi.org/10.3390/app13084687>

Academic Editor: Monica Gallo

Received: 6 February 2023

Revised: 4 April 2023

Accepted: 6 April 2023

Published: 7 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Bee drone brood is a rarely used bee product, which is characterized by a rich chemical composition, which makes it biologically active. It contains approximately 40% protein, 30% reducing sugars, but also hormones, mainly sex hormones: testosterone (0.29–0.31 nmol/100 g), estradiol (431.2–847.90 nmol/100 g), progesterone (42.6–51.3 nmol/100 g), and prolactin (344.6–475.4 nmol/100 g) [1]. Additionally, it is also a good source of vitamins and bioelements, mainly phosphorus, potassium, calcium, iron, and zinc. Freeze-dried drone brood (named Apilarnil or Apistimul) is available for sale mainly in Eastern European countries as a dietary supplement or one of its ingredients. Thanks to preservation by freeze-drying, it can be stored for up to two years [2]. The rich chemical composition and confirmed biological activity of drone brood could indicate its potential use to equalize the hormonal system in people of both sexes [3]. Due to this, drone brood is applied in the treatment and prevention of various diseases, including osteoporosis and male infertility, hypothyroidism, liver diseases, psychiatry, adaptogenic therapies, as well as in malnutrition in the treatment of children [4–9]. However, there is a lack of scientific data confirming the effectiveness of drone brood in vivo, and the in vitro bioaccessibility of its components is unknown.

Osteoporosis is a global problem that affects people of both sexes, more often women than men, and the incidence of its occurrence clearly increases in people over 60 years of age [10,11]. Sex hormone deficiency has adverse effects on bone growth and modeling,

ultimately reducing peak bone mass and setting the stage for osteoporosis in later life. This disorder is characterized by the thinning of bone tissue, which results in low bone mass and a disturbed bone structure, increasing the likelihood of bone fractures [12,13]. A properly balanced diet plays a very important role in the prevention of osteoporosis and can reduce age-related bone loss and fracture risk. The crucial issue is proper calcium (1000–1200 mg/day) and vitamin D (800–1200 IU/day) supplementation [13,14]. However, a greater benefit is achieved when calcium is introduced into the diet in small proportions, avoiding oscillator spikes that could lead to cardiovascular complications [15]. Recently, plant-derived phytoestrogens with estrogenic effects (e.g., genistein, daidzein, icariin, dioscin, and *Ginkgo biloba* extracts) were also proposed as agents for prophylactics of steroid-induced osteoporosis, which could provide a safer alternative to primary pharmacological strategies [16–18].

Recently, shells of chicken eggs have been proposed as a natural source of calcium in the prevention and treatment of osteoporosis [19–21]. This natural product, which is bakery waste, is an interesting alternative to the currently used inorganic forms of calcium. Moreover, eggshells are an inexpensive calcium source and are accessible at home. Chicken eggshells contain about 95% calcium carbonate and 3.5% of glycoproteins and proteoglycans; therefore, they could be a valuable natural source of calcium with a higher solubility compared to the oyster shells that are currently used [22]. Additionally, the inner membrane of the eggshell contains glucosamine, chondroitin sulphate, hyaluronic acid, type I collagen, and a large number of microelements such as magnesium, strontium, zinc, barium, and fluorine, making them an excellent biomaterial for the production of new dietary supplements that positively affect bone metabolism [22–25]. Furthermore, a better calcium absorption from eggshells was found than from calcium carbonate, due to its porous structure which facilitates digestion [26,27].

The aim of this study was to combine beneficial compounds of drone brood (hormones, proteins, antioxidants, and bioelements) and hen eggshells to design a new natural dietary supplement with enhanced bioaccessibility tested in vitro. The use of drone brood for the production of dietary supplements could broaden the range of products offered by beekeeping and increase beekeepers' income.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Chemicals: 1-propanol, ninhydrin, ethyl acetate, methanol, formic acid NP reagent, PEG 400, 1-butanol, 2-propanol, boric acid, aniline-diphenylamine-phosphoric acid reagent. Standards: valine, histidine, leucine, glycine, aspartic acid, proline, lysine, glutamic acid, ferulic acid, ellagic acid, vanillin, kaempferol, apigenin 7-glucoside, Laemmli Buffer, Coomassie Brilliant Blue G-250, HCl, NaCl, NaHCO₃, pepsin from porcine gastric mucosa and NIST1515 certified reference material were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), Lipancrea from Polfa (Warszawa, Poland), the Elisa Test Kit for testosterone (abx574314) and estradiol (abx574169) from Abbexa (Cambridge, UK), the Calcium Assay Kit ab102505 from Abcam (Cambridge, UK). Bradford reagent: Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentration (Hercules, CA, USA), ROTI[®]Mark BI-PINK (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany).

2.2. Drone Brood Collection

Drone brood (7-day-old) samples were collected from one apiary in the southeastern part of Poland (Podkarpackie Voivodeship) in June 2022. The drone brood (total 200 g) of *Apis mellifera carnica* was manually selected from the one-half drone frame, immediately sealed in sterile containers, and transferred to the laboratory. The samples were homogenized using a tissue homogenizer with 7 mm plastic Omni Tips TM (TH 02, Omni International, Kennesaw, GA, USA). The material was frozen at −70 °C and then freeze-dried (using Alpha 1–2, LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode,

Germany). Dehydration was carried out for 72 h by cooling the sample to $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ at a standard pressure of 0.1 bar. Lyophilizate was used to prepare the capsules.

2.3. Chicken Eggshell Collection and Processing

For this study, organic ($n = 30$) and farm cage ($n = 30$) hen eggs were collected. The shells were separated from the eggs, and the membrane was additionally separated from the shells. First, the microbiological purity of fresh eggshells was verified. The shells were washed with distilled water (10 mL) to obtain an assay solution, which was then applied to a 2% agar medium (0.1 mL of each sample). The samples were incubated in an incubator at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h. After this time, the colonies grown on the plates were evaluated. The colony smear was observed under a microscope (Delta Optical Genetic Pro, Mińsk Mazowiecki, Poland) to determine the types of bacteria. The shells were heated for 30 min at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, cooled, and then ground in an electric mill (MMK-06M, Milanówek, Poland). The eggshell powder was again controlled in terms of microbiological quality. Briefly, 1 g of the appropriate thermally treated powder was suspended in 10 mL of distilled water. The suspension was analyzed as described above. The obtained eggshell powder was stored tightly closed in a desiccator under strictly controlled environmental conditions until analysis.

2.4. Preparation of a Dietary Supplement Based on Drone Brood and Eggshell Powder

To prepare the supplement, gelatin shells (0.90 mg each) purchased in one of the local stores were used. The composition of the prepared versions of the supplements (DB + ES and DB + CC) is shown in Table 1. For comparison, capsules containing single components in the doses used were also prepared (ES, CC, and DB).

Table 1. The composition of prepared dietary supplements.

Supplement	Code	Drone Brood	Eggshell of Organic Eggs	Calcium Carbonate
Organic Ca	ES	-	250 mg (=95 mg Ca)	-
Inorganic Ca	CC	-	-	250 mg (=100 mg Ca)
Hormones	DB	300 mg =0.0024 nmol testosterone =1.99 nmol estradiol	-	-
Hormones + Organic Ca (3.2:1)	DB+ES	300 mg	250 mg	-
Hormones + Inorganic Ca (3:1)	DB+CC	300 mg	-	250 mg

Each of the given variants was filled in one gelatin capsule (90 mg each) using a manual encapsulator (Capsule Connection, LCC, Prescott, AZ, USA). Three capsules were prepared in each variant.

2.5. Analysis of the Mineral Composition of Eggshells Using the ICP-OES

The content of selected minerals in the hen eggshells was determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) using a Thermo iCAP 6500 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). The samples were subjected to a mineralization process with nitric acid (temp. $200\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Milestone Ethos One, Łomianki, Warsaw, Poland). The detection limit for each element was set at a level greater than $1\text{ }\mu\text{g/L}$. The curve fit coefficients (R^2) for all elements tested were above 0.99. All analyses were performed in three independent replicates for each sample. The repeatability of the target was expressed as a relative standard deviation (RSD), and the recoveries of the target were 92–106%, respectively. The method has been validated using a certified reference material (NIST1515). The response of the equipment was periodically checked against known standards. To identify the appropriate measurement lines and avoid possible interference, the method of adding an internal standard was used. Yttrium and ytterbium ions at concentrations of 2 mg/L and 5 mg/L were used as internal standards.

2.6. Calcium Assay Test

For the evaluation of soluble calcium content, a colorimetric Calcium Assay Kit (ab102505) was used. To 50 μL of the analyzed sample, 90 μL of a chromogenic reagent was added. Then, 60 μL of a calcium assay buffer was added. The samples were mixed and incubated at room temperature for 10 min and protected from light. Absorbance was measured on a microplate reader at a wavelength of 575 nm. The results were calculated according to the equation of the calibration curve prepared for calcium standards attached to the kit, within a concentration range of 0.0625–2 $\mu\text{g}/\text{sample}$ ($y = 0.8432x$, $R^2 = 0.9985$).

2.7. In Vitro Bioaccessibility of the Supplement Components

The study of the bioaccessibility of the designed supplement components was carried out according to the instructions of Vitali et al. [28] with minor modifications. Each capsule variant was analyzed in duplicate. As the digested mixture, 1 capsule each of the prepared variants was used. A total of 10.5 mL of distilled water was added and heated at 37 °C for 10 min in a laboratory incubator to dissolve the gelatin shell. After this time, a control sample (not digested) was taken. The samples were dispersed with 0.5 mL of pepsin in gastric juice (0.5 mg/mL of pepsin in 0.1 M HCl; adjusted to pH 2 with 5 M HCl) and incubated in a lab incubator for 1 h at 37 °C; every 15 min the samples were shaken for 2 min. After neutralization (1 M NaHCO_3), the gastric (stomach) fraction was taken. The samples were supplemented with simulated intestinal juice (bile: pancreatin, 12:2 g/L), NaCl: KCl (120:5 mmol/L) and incubated for the next 2 h under the same conditions as described above. The digested samples were then centrifuged at $4100 \times g$ for 20 min, and selected parameters were determined in the obtained supernatants. Until further analysis, the samples were stored at -20 °C. In the case of the ES and CC capsules, only calcium and polyphenol content was measured, whereas in the case of the DB, DB + ES and DB + CC samples, the evaluated compounds included calcium, testosterone, estradiol, protein and polyphenolic compounds' content, as well as amino acids' profile, and FRAP-reducing power.

The bioaccessibility index BI [%] for calcium, hormones, polyphenols, and antioxidants was calculated according to the following equation:

$$\text{BI} [\%] = (\text{Bdigested} / \text{Bundigested}) \times 100$$

where BI [%]—bioaccessibility of bioactive compounds; Bdigested—the concentration of bioactive compounds in digested (gastric/intestinal) phase; Bundigested—the concentration of the bioactive compound in the nondigested phase.

The soluble protein digestibility was calculated using the same formula. The percentage calculated in gastric and intestinal fractions was assumed to correspond to undigested proteins.

2.8. Soluble Protein Assay

The protein content in the samples was determined by the Bradford method according to Sidor et al. [29]. The absorbance was read at 595 nm using a microplate reader (EPOCH 2, BioTek, Winooski, VT, USA). The results were calculated based on a calibration curve 1.8–250 $\mu\text{g}/\text{per sample}$ ($y = 0.0424x$, $R^2 = 0.9658$). Bovine albumin was used as a standard.

2.9. Protein Profiling by SDS-PAGE

For the determination of proteins in supplement fractions after in vitro digestion, 30 μL of each sample was heated for 5 min at 100 °C with 15 μL of a standard Laemmli buffer immediately before application. After cooling, denatured samples (20 μL of each) were applied to a 12.5% denaturing gel (with 5% stacking gel). Electrophoresis was carried out initially at 50 V (15 min) and then at 150 V for 2 h using Bio-Rad PowerPac 3000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The prestained ROTI[®] Mark BI-PINK (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) was used as a molecular weight marker. After electrophoresis, the gel was stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 overnight and then washed for 24 h with a decolorizing solution consisting of ethanol, acetic acid, and water in order

to remove the dye. The gel was scanned and processed with Epson Perfection V850 Pro (Simatupang, Jakarta Selatan, Indonesia).

2.10. Hormonal Activity Determination

Estradiol and testosterone in the undigested (10% suspension) and digested samples were tested with the use of immunoenzymatic ELISA test kits (abx574314, abx574169 for testosterone and estradiol, respectively), strictly according to the manufacturer's manual (Abbexa, Cambridge, UK). The absorbance was immediately measured at 450 nm and recalculated according to the prepared calibration curve in pg/mL for testosterone, $y = -0.408 \ln(x) + 2.968$, ($R^2 = 0.945$) and for estradiol, $y = -0.644 \ln(x) + 4.977$, ($R^2 = 0.914$). The results were expressed in nmol/capsule [1].

2.11. Antioxidants Assay

2.11.1. FRAP Test

The FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) test was performed according to Sidor et al. [29]. The results were expressed as equivalent Trolox μmol (TE) per one capsule ($\mu\text{mol}/\text{capsule}$) from the Trolox calibration curve, prepared for Trolox in the range 25–300 nmol TE/mL ($y = 0.152x$, $R^2 = 0.9989$).

2.11.2. Total Phenolic Content (TPC) Assay

The total content of phenolic compounds was determined using the Folin–Ciocalteu reagent according to Sidor et al. [29] and adapted to use microplate analyses. The results were calculated based on a calibration curve prepared for gallic acid in the range 0–125 μg GAE/mL ($y = 0.336x$, $R^2 = 0.9914$).

2.12. HPTLC Analysis

A comparative analysis of free amino acids and polyphenolics for undigested and digested fractions of supplements were performed on HPTLC Silica Gel 60 F254 plates (20×10 cm) purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The selected fraction extracts were applied to the plate (10 μL for polyphenols, amino acids were analyzed applying samples in volumes corresponding to the same protein concentration) as 8 mm bands from the lower edge of a plate at the rate of 150 nL/s using a semiautomated HPTLC application device (Linomat 5, CAMAG, Muttenz, Switzerland).

A chromatographic separation was performed in a chromatographic tank saturated for 20 min with the appropriate mobile phase (Table 2) and developed at a distance of 70 mm. The results obtained were documented using an HPTLC imaging device (TLC Visualizer, CAMAG) under white light (for amino acids and sugars) with a total of 366 nm (for polyphenols). In addition, each plate was derivatized using an automated derivatizer of TLC plates (CAMAG Derivatizer). The obtained chromatographic images were analyzed using the HPTLC software (Vision CATS, CAMAG).

Table 2. Details of separations performed on HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄.

Identified Group	Mobile Phase (v:v:v)	Derivatization Reagent	Used Standards
Amino acids	1-propanol, H ₂ O (7:3)	ninhydrin	valine, histidine, leucine, glycine, aspartic acid, proline, lysine, glutamic acid
Polyphenols	ethyl acetate, methanol, water, formic acid (50:4:4:2.5)	NP reagent, PEG 400	ferulic acid, ellagic acid, vanillin, kaempferol, apigenin 7-glucoside

2.13. Statistical Calculations

All calculations were made in triplicate. For the data obtained, mean values and standard deviations were calculated. Significant differences were calculated by one-way ANOVA followed by Tukey's test ($p = 0.05$), differences compared to the undigested samples were checked with Student's t-Test ($p = 0.05$), and standard deviations for the obtained results were calculated. All calculations were made using the Statistica 13.3 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

3. Results and Discussion

Two natural raw materials were used to produce the natural dietary supplement: freeze-dried drone brood and ground chicken eggshells, which were mixed in a fixed proportion and sealed in gelatin shells purchased in one of the local stores. At the beginning, the quality of the raw materials was checked, and the drone brood was selected based on previous research [29]. As a source of natural calcium, the use of two raw materials was considered: eggshells from organic and farmed eggs. The selection of the material was preceded by a comparative analysis of the chemical content and evaluation of the microbiological purity of the shells.

3.1. Eggshell Quality Analysis

The quality of eggshells as a potential natural source of bioavailable calcium was first evaluated regarding its mineral content and microbial contamination. Table 3 summarizes the results of the mineral profile of powder from hen eggshells obtained from various hen rearing systems. The main bioelement present in eggshell powder was found to be calcium (31.9 g/100 g on average) in the form of calcium carbonate, which constitutes 96% of the mineral composition. This element was accompanied by significant amounts of magnesium (average 483.1 mg/100 g), sulfur (average 446.99 mg/100 g), sodium (96.12 mg/100 g), and potassium (average 52.45 mg/100 g). Additionally, eggshells have been shown to contain trace amounts of the essential elements, chromium and copper (values in the range of 0.04–0.3 mg/100 g), and only traces of cadmium and arsenic were found, as well as lead and nickel. Furthermore, the effect of the hen rearing system was found negligible ($p < 0.05$). The results presented are comparable to those reported by Brun et al. [20] who showed that eggshells are essentially composed of calcium (382 mg/g), sodium (5.1 mg/g), phosphorus (4.4 mg/g), and potassium (1.4 mg/g). Furthermore, Bartter et al. [24] showed a similar level of calcium in eggshells, in the range of 360 to 400 mg/g of eggshell.

Although microbiological contamination was detected for 80% of the fresh shells tested, numerous (uncountable) colonies were found for 15% of the samples only (Figure S1). Surprisingly, the caged eggs were more contaminated than the organic ones. Rod-type bacteria and streptococci were identified mainly in the microscopic image (Figure S2). The microbiological analysis of the heat-treated powders did not show any grown colonies in both caged and farm egg powders.

3.2. Supplement Design

Supplements based on drone brood and chicken eggshell powder have been prepared on the basis of recommendations that clearly declare the daily need for each component separately. For drone brood, a safe daily intake of 70 to 900 mg of drone brood per day was suggested [2]. The average daily calcium intake from both foods and supplements is 1156 mg for men and 1009 mg for women [30]. Assuming the dosage of the designed supplement is two capsules a day, the recommended daily dose will be filled by an adult, on average, in 66% for drone brood (max dose) and 50% for calcium (1000 mg on average).

Table 3. The mineral content of the powdered shells of the eggs of various hen rearing systems.

	Cage Rearing [mg/100 g d.m. ± SD]	Organic Farming [mg/100 g d.m. ± SD]	Average Content [mg/100 g d.m. ± SD]	Percentage [%]
Al	0.12 ± 0.29 ^a	0.48 ± 0.30 ^b	0.30 ± 0.11	0.0009
As	0.04 ± 0.07 ^a	0.03 ± 0.04 ^a	0.04 ± 0.009	0.0001
Ca	32,362.79 ± 503.94 ^a	31,417.52 ± 678.54 ^a	31,890.15 ± 473.06	96.15
Cd	0.002 ± 0.004 ^a	0.002 ± 0.001 ^a	0.002 ± 0.00	0.0001
Cr	0.12 ± 0.08 ^b	0.004 ± 0.008 ^a	0.08 ± 0.00	0.0002
Cu	0.13 ± 0.03 ^b	0.05 ± 0.030 ^a	0.09 ± 0.02	0.0002
Fe	4.30 ± 1.69 ^a	4.86 ± 1.33 ^a	4.58 ± 1.33	0.14
K	48.24 ± 0.75 ^a	56.67 ± 1.40 ^a	52.45 ± 2.75	0.16
Mg	508.73 ± 4.95 ^b	457.49 ± 8.15 ^a	483.11 ± 3.60	1.45
Mn	0.20 ± 0.09 ^a	0.21 ± 0.103 ^a	0.20 ± 0.06	0.0006
Mo	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Na	87.26 ± 0.54 ^a	104.99 ± 1.52 ^b	96.12 ± 0.54	0.02
Ni	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P	194.49 ± 2.83 ^b	139.68 ± 4.35 ^a	167.08 ± 2.83	0.57
Pb	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
S	445.83 ± 3.14 ^a	448.15 ± 12.47 ^a	446.99 ± 3.14	1.34
Sr	20.93 ± 0.17 ^a	32.15 ± 1.31 ^b	23.28 ± 1.31	0.07
Zn	0.48 ± 0.53 ^a	0.44 ± 0.02 ^a	0.44 ± 0.01	0.001
TOTAL	33,673.82	32,662.23	33,164.91	100%

d.m.—dry mass; n.d.—not detected; ^{a,b}—the means marked with different letters in the rows differ statistically significantly.

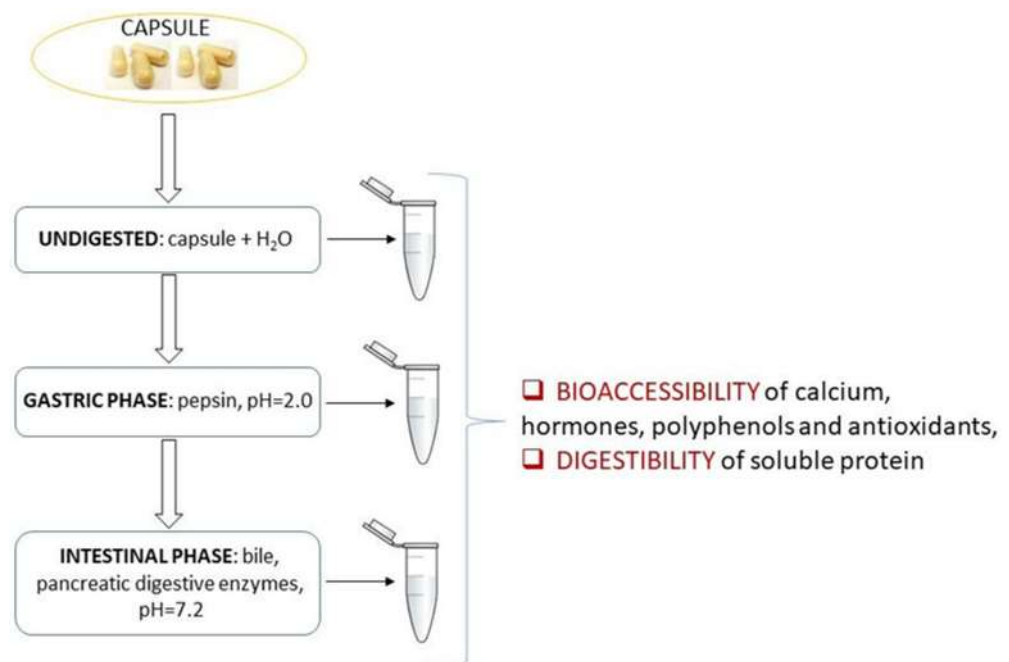
3.3. In Vitro Digestion Study

The development of an in vitro model to predict bioaccessibility should include digestive transformations of food into material ready for assimilation and absorption/assimilation steps that predict absorption into the intestinal epithelial cells [31]. Bioavailability can be defined as the amount or fraction of components that are released from food ingested in the gastrointestinal tract and become available for absorption in the intestine [31]. In the laboratory, bioaccessibility assessment involves the digestion of food using selected procedures, which simulate gastric and small intestinal digestion [32]. The bioaccessibility of components of the designed supplement (DB + ES), including calcium, hormones, proteins, polyphenols, and reducing power, was evaluated, and the results are summarized in Table 4. For completeness, digestion was performed under identical conditions for the inorganic calcium supplement variant (DB + CC), single components (DB, ES and CC), and capsule shells alone (Table 4). The release of individual ingredient groups in the simulated gastrointestinal tract has been considered separately and is described below (Figure 1). The comparison of the calculated values of the bioaccessibility index (BI%) for both variants of the supplement (DB + ES and DB + CC) compared to pure brood (DB) are shown in Table 4.

Table 4. Comparison of the bioaccessibility of protein, calcium, testosterone, estradiol, polyphenolic compounds, and antioxidants in the tested fractions.

Sample	Tested Fraction before/after Digestion	Proteins [mg/Capsule \pm SD]	Calcium [mg/Capsule \pm SD]	Testosterone [nmol/Capsule \pm SD]	Estradiol [nmol/Capsule \pm SD]	TPC [mgGAE/Capsule \pm SD]	FRAP [μ molTE/Capsule \pm SD]
ES (250 mg/capsule)	Undigested	6.09 \pm 2.13	78.7 \pm 15.52	n.t.	n.t.	n.d.	n.d.
	Gastric phase	4.22 \pm 0.67 *	72.45 \pm 0.37	n.t.	n.t.	n.d.	n.d.
	Intestinal phase	0.88 \pm 1.53 *	82.60 \pm 1.24	n.t.	n.t.	n.d.	n.d.
CC (250 mg/capsule)	Undigested	n.t.	100.00 \pm 17.102	n.t.	n.t.	n.d.	n.d.
	Gastric phase	n.t.	9.20 \pm 0.12 *	n.t.	n.t.	n.d.	n.d.
	Intestinal phase	n.t.	10.28 \pm 0.04 *	n.t.	n.t.	n.d.	n.d.
DB (300 mg/capsule)	Undigested	114.22 \pm 3.84	0.10 \pm 0.02	0.011 \pm 0.00	1.28 \pm 0.07	2.28 \pm 0.30	8.37 \pm 0.56
	Gastric phase	18.18 \pm 2.63 *	0.29 \pm 0.03 *	0.0019 \pm 0.00 *	n.d.	1.74 \pm 0.35 *	3.52 \pm 0.36 *
	Intestinal phase	13.62 \pm 2.96 *	0.72 \pm 0.10 *	0.0063 \pm 0.00 *	0.35 \pm 0.02 *	2.12 \pm 0.60	4.41 \pm 0.56 *
DB + ES (300 mg + 250 mg/capsule)	Undigested	45.19 \pm 5.49	43.34 \pm 4.12	0.0060 \pm 0.00	1.08 \pm 0.03	2.56 \pm 0.11	3.54 \pm 0.06
	Gastric phase	7.62 \pm 1.15 *	38.96 \pm 1.01 *	0.0025 \pm 0.01 *	n.d.	1.56 \pm 0.19 *	2.81 \pm 0.25 *
	Intestinal phase	2.99 \pm 0.36 *	45.57 \pm 0.11	0.0098 \pm 0.03 *	0.23 \pm 0.07 *	1.34 \pm 0.30 *	2.88 \pm 0.09 *
DB + CC (300 mg + 250 mg/capsule)	Undigested	40.95 \pm 2.00	58.05 \pm 3.41	0.012 \pm 0.00	1.11 \pm 0.04	1.97 \pm 0.08	3.47 \pm 0.13
	Gastric phase	22.10 \pm 4.25 *	5.55 \pm 0.50 *	0.0048 \pm 0.03 *	n.d.	1.42 \pm 1.40 *	4.21 \pm 1.54 *
	Intestinal phase	14.23 \pm 10.57 *	6.66 \pm 0.13 *	0.0136 \pm 0.03	0.30 \pm 0.08 *	1.22 \pm 1.75 *	3.33 \pm 0.60
Control (capsule alone)	Undigested	<0.035	n.t.	n.t.	n.t.	0.05	n.d.
	Gastric phase	n.d.	n.t.	n.t.	n.t.	n.d.	n.d.
	Intestinal phase	n.d.	n.t.	n.t.	n.t.	n.d.	n.d.

Results marked * differ statistically significantly compared to the undigested fraction within the supplement. n.d.—not detected, n.t.—not tested.

**Figure 1.** Diagram of the in vitro digestion performed.

3.4. Calcium

The percentage of calcium absorbed from supplements, as with that from foods, depends not only on the source of calcium but also on the total amount of elemental calcium consumed at one time; as the amount increases, the percentage absorbed decreases. Absorption from supplements is highest at doses of 500 mg or less. For example, the body absorbs about 36% of a 300 mg calcium dose and 28% of a 1000 mg dose [30]. During the simulated in vitro digestion of the capsules produced, the ability of calcium available to assimilation in an organism was checked (Table 4). Although a higher amount of calcium was contained in calcium carbonate (CC) than the eggshell capsule (ES) (by 21.3%), the calcium showed a much greater release capacity (92.05% in the stomach and 104.82% in

the intestines) compared to calcium carbonate (9.21% in the stomach and 10.28% in the intestines) (Figure 2b). What is valuable, a high bioaccessibility index of calcium from drone brood (DB) was demonstrated (290% in the stomach and 720% in the intestine). Calcium from DB + ES was released to a much greater extent (89.89% and 105.14% in the stomach and intestines, respectively) compared to DB + CC, where the calcium absorption capacity was only 10.08% in the stomach and 12.09% in the intestines. Kusumi et al. [33] studied the digestibility of calcium supplied in various forms and found that eggshell calcium was significantly more available than synthetic calcium carbonate. This result suggests that eggshell powder dissolves more easily in gastric juice due to its porous structure, making it easier to absorb compared to synthetic calcium compounds. Due to the favorable bioaccessibility of calcium, eggshells have been proposed as an additive to various types of foods, in order to increase the supply of this element, especially in the diet of people exposed to its deficiencies [24,34].

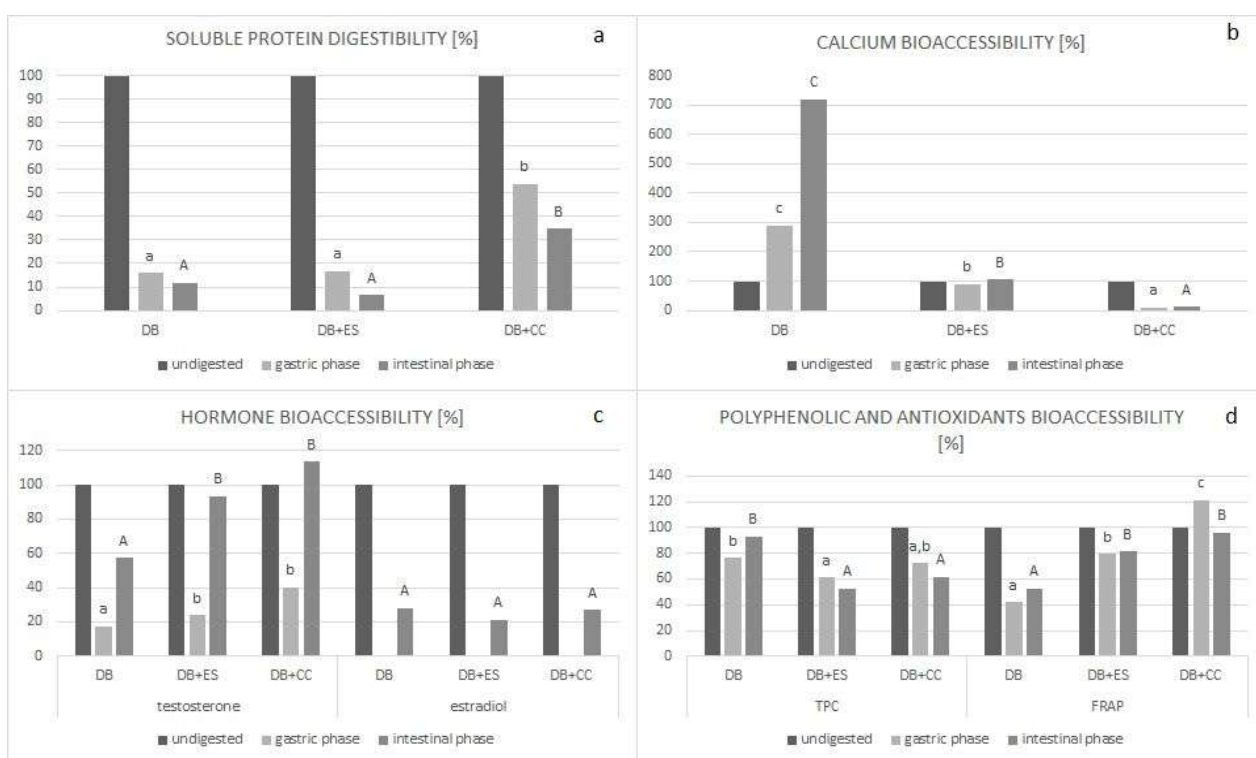


Figure 2. Digestibility index [%] of (a) proteins, and bioaccessibility index [%] of (b) calcium, (c) hormones, (d) polyphenols, and the reducing power of the tested capsule fractions. ^{a,b,c}—the results marked with different letters differ statistically significantly between the gastric fractions of the supplements ($p < 0.05$); ^{A,B,C}—the results marked with different letters differ statistically significantly between the intestinal fractions of the supplements ($p < 0.05$).

The effect of eggshell calcium on changes has long been tested in *in vitro* and *in vivo* studies. Sakai et al. [26] found that eggshell calcium is more efficient compared to calcium carbonate in increasing bone mass in women, indicating its potential use as a calcium supplement in human nutrition. Omelka et al. [27] evaluated the effects of calcium-rich chicken eggshell powder and the inorganic form of calcium carbonate on osteoporotic bone structure using an animal model of ovariectomized rats. They observed that chicken eggshell powder more effectively ameliorates bone loss in ovariectomized rats than inorganic calcium. Eggshell treatment significantly lowered bone resorption, increased plasma calcium levels, the relative volume of trabecular bones, and secondary osteon population density, which together improved bone strength. As an explanation of observed differences, the authors presented the differences in the bioavailability of calcium carbonate, which is

only around 20–30% [35]. On the other hand, the calcium bioavailability in eggshells can be influenced and increased by the presence of other minerals, important for bone health.

3.5. Steroid Hormones

In studies of the content of sex hormones involved in bone formation, it was found that during capsule digestion, the bioaccessibility of both hormones increased (Table 4). The testosterone in the DB + ES capsule has been shown to have an absorption capacity in the intestine than that contained in the DB capsule. Furthermore, a lower absorption capacity of the hormone analyzed from the DB + CC capsule was found by 50% compared to DB + ES. The greatest ability of testosterone to be released from the matrix was demonstrated in the intestinal phase, where it was emulsified in the presence of bile acids while its bioaccessibility increased (Figure 2c). Testosterone has a very low solubility in water. Preparations with testosterone in the composition show an absolute bioavailability of 4% in the state after a meal. When eating a medium to high fat meal, testosterone in the digestive tract is combined with fat by bile acids. Once emulsified, testosterone is incorporated into chylomicrons and absorbed by the lymph [36]. This may also be related to zinc, which is naturally present in eggshells (0.44 mg/100 g of dry weight) and which facilitates the release and absorption of testosterone [37].

The study of estradiol content showed its presence in the undigested and intestinal fraction. The presence of calcium is not favorable for the release of this hormone; however, the effect was 27.02% higher in the case of DB + CC capsules compared to the DB + ES ones (Table 4). Due to the hydrophobic nature of both hormones, their release in the gastrointestinal tract is similar; they become bioavailable only after emulsification of the digested content, which occurs in contact with bile [37].

Sex steroid hormones play a key role in the development and maintenance of the skeleton in both men and women. Estradiol and testosterone levels, especially the free or bioavailable fractions, decline with increasing age in both men and women and likely contribute to bone loss and fractures [38]. Menopause and the accompanying loss of ovarian estrogens are associated with a decrease in bone mineral density (BMD). During male andropause, testosterone levels decline, knocking down estrogen, thereby reducing any protective benefits and reducing bone rejuvenation and bone mineral density (BMD). By replacing lost hormones, hormone balance can be restored, and bone health can be improved. However, long-term hormone replacement therapy (HRT) is controversial because of increases in the risk of breast carcinoma, endometrial cancer, thromboembolic events, and cardiovascular diseases [39].

Little is known about the impact of drone brood on the body hormonal balance. The latest research [40] confirmed the stimulatory effects of the application of bee drone larvae (BDL) on the beneficial androgenic effects and growth performance of male goats and male kids, but treating the female animals, used for reproductive purposes, provided inconsistent results [41]. Supplementation with DBH stimulated the early stages of folliculogenesis in gilts, but provoked atresia in the last stage of follicular development. However, the results cited confirmed the biological properties of the bee drone brood as an ideal additive for growth promotion in animal husbandry instead of banned hormonal anabolics.

3.6. Protein

In vitro protein digestibility was tested on soluble protein content, protein degradation profiles (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)) and HPTLC profiles of free amino acids. The analysis of protein digestibility in the prepared capsules showed that the ES capsule itself contained a small amount of soluble protein, probably derived from the cuticle (Table 4). Drone brood is the main source of soluble protein in the capsules analyzed. Among all the prepared preparations, the highest protein content was found in the DB capsule with the highest share of drone brood (300 mg of drone brood/capsule), compared to DB + ES or DB + CC (300 mg of drone brood/capsule of 550 mg). In the gastric phase, it was found that the protein is best digested in the DB

and DB + ES capsules (84.09 and 83.13%, respectively). A significantly lower percentage of protein digestion was also observed in the DB + CC (46.03%) capsule. In the intestinal fractions after *in vitro* digestion was found, a high level of protein digestion in the DB + ES capsule at a level of 60.76% was present. Significantly lower results were shown for the DB + CC capsule, which was 25.15% lower compared to the DB + ES capsules (Figure 2a).

SDS-PAGE protein profiling was performed to understand changes in protein content during *in vitro* digestion of the supplement capsules. Most of the proteins came from the drone brood (Figure 3). The undigested DB sample showed a rich protein profile of 10, 12, 25, 26, 40, 42, 61, 70, 74, 80, 115, 130, and 175 kDa. In all the samples, further digestion in the stomach resulted in the elimination of a large amount of protein and the generation of fuzzy bands (10, 42, and 72 kDa). This indicates that the organized protein network began to disintegrate in the gastric phase, and most of the protein macromolecules disintegrated rapidly. In the intestinal fractions of the preparations, mainly bands with a mass of 10, 26, 42, 74, and 130 were identified, and their intensity was higher compared to the non-digested fractions. This may indicate the participation of digestive enzymes (lipase, amylase, and protease) in the protein profile of the intestinal fraction, whose molecular weights are 48, 56, and 22 kDa, respectively [42].

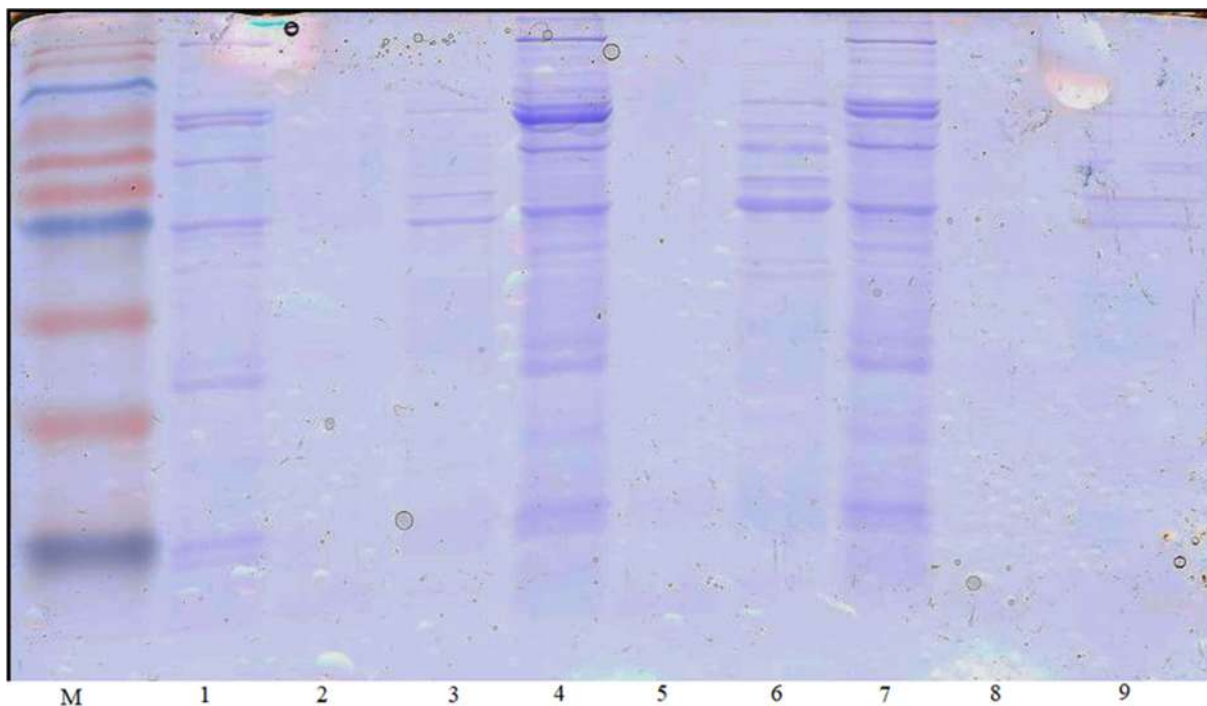


Figure 3. Protein profiles of fractions obtained by SDS-PAGE. M—molecular weight marker; 1—DB (undigested); 2—DB (gastric phase); 3—DB (intestinal phase); 4—DB + ES (undigested); 5—DB + ES (gastric phase); 6—DB + ES (intestinal phase); 7—DB + CC (undigested); 8—(gastric phase); 9—DB + CC (intestinal phase).

Similar observations were made by other researchers [43]. The authors tested the protein content by electrophoresis in soy milk. They showed that after digestion in the oral cavity, the protein content did not change, which could be influenced by the lack of enzymes responsible for protein digestion in the oral cavity. After 5 and 60 min of digestion in the stomach, the number of bands and their intensity decreased significantly compared to the undigested sample, with a significant decrease in protein content after 5 min. However, after 30 and 120 min of digestion in the intestines, they observed an intensification of some bands with a mass of 25 and 35 kDa, compared to the gastric fraction.

3.7. Free Amino Acids

The qualitative free amino acid profile during *in vitro* digestion was determined by HPTLC, and the results are shown in Figure 4. The undigested samples showed a very similar amino acid profile, where glycine ($R_f = 0.28$), valine ($R_f = 0.45$), and leucine ($R_f = 0.55$) were identified. A slightly weaker band intensity, i.e., lower amino acid content, was observed for the DB + CC gastric fraction. Fractional analysis after the end of digestion (intestinal phase) showed an intensification of previously visible bands, mainly glycine, valine, and leucine. The higher content of amino acids in the intestinal fraction is the result of protein breakdown during digestion. Protein content at each stage decreases, while free amino acids increase. In an earlier study, Ref. [29] characterized the amino acid profile of drone brood using high performance thin layer chromatography (HPTLC) for the first time, and we found more amino acids, including histidine, lysine, proline, glycine, valine, leucine, and tyrosine. However, the separation was conducted under different conditions; therefore, the obtained results cannot be unequivocally compared. Margaoan et al. [44] also found a richer amino acid profile for Apilarnil (freeze-dried drone brood). The authors identified the highest amounts of proline, alanine, lysine, and glycine, and the total content of free amino acids was 1830.07 mg/100 g of Apilarnil.

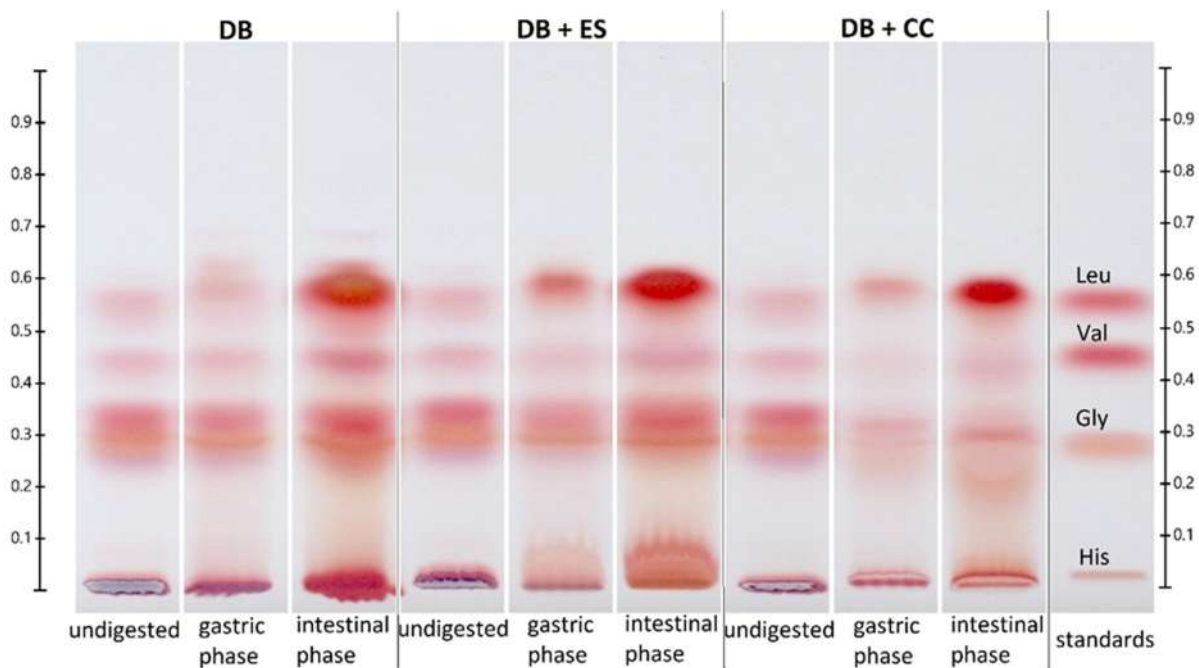


Figure 4. Increase in free amino acids in drone brood (DB) and designed supplements (DB + ES and DB + CC) during *in vitro* digestion.

3.8. Antioxidants

The analysis of the bioaccessibility of antioxidant compounds was carried out using the FRAP method (Table 4). The capsule containing the only drone brood was found to have the greatest reducing potential, which is due to its highest concentration in the capsule. No reducing potential was found in the ES and CC capsules; therefore, the addition of calcium in both forms reduces the share of drone brood in the capsule by 45.46%, which in turn reduces the antioxidant properties of the undigested fraction, compared to the DB capsule. Taking into account the reduction of the share of drone brood in the DB + ES and DB + CC capsules (up to 54.54% in both cases), a reduction in the reducing potential was found in the DB + ES capsule by 22.36%, and in the DB + CC capsule by 23.90%. The decrease in antioxidant properties in supplements appears to indicate that calcium may block the release of antioxidant compounds or there are interactions between ingredients. After digestion in the stomach and intestines, the FRAP values of all samples

decreased, which may be due to the digestion of the compounds. Similar results were obtained by Seraglio et al. [45], who examined the availability of antioxidant compounds in varietal honeys and showed a decrease in the antioxidant potential in the intestinal fraction compared to the undigested fraction (by up to 33%).

It is commonly accepted that antioxidant activity is formed mainly by polyphenols which have anti-inflammatory and anticancer properties [46]. Long-term consumption of foods rich in polyphenols, mainly of plant origin, has been shown to improve conditions of osteoporosis [47]. Due to this, the polyphenol bioaccessibility of the capsules produced was evaluated and is shown in Figure 2d. The content of phenolic compounds in the undigested fraction ranged from 1.97 to 2.28 mg/capsule (for DB + CC and DB, respectively). These compounds were not detected in the prepared eggshell (ES) and calcium carbonate (CC) capsules, which confirms that the drone brood is the only source of phenolic compounds in the designed supplements. The capsule prepared on the basis of brood and eggshells was found to show a 23% higher content of phenolic compounds compared to the DB + CC capsule, which may indicate that calcium carbonate—a synthetic compound—reduces the release of polyphenols from drone brood, whereas compounds derived from eggshells support the release of polyphenols from the matrix. Phenolic compounds were the most bioaccessible in the drone brood (76.31 and 92.98% in the gastric and intestinal fractions, respectively). In addition, the phenolic compounds with DB + ES also showed high bioaccessibility: 60.93 and 52.34% in the gastric and intestinal phases, respectively. However, the recorded values were lower than in the case of DB capsules by 11.33% and 9.37% in the gastric and intestinal fraction.

The bioaccessibility of phenolic compounds was conducted in an extended simulation of *in vitro* digestion for various samples. As the total content of phenolic compounds, the researchers assumed the sum of extractable and hydrolysable fractions, with the hydrolysable fractions being several times higher than the extractable fractions, discussed in this paper as the undigested phase [28,45]. Seraglio et al. [45] analyzed the bioavailability of phenolic compounds from varietal honeys using a digestion simulation method analogous to our method. The authors showed that the sum of individual phenolic compounds in the undigested fraction was 46.66% lower compared to the intestinal fraction. The possibility of a food matrix, as well as slight differences in digestion conditions, may have influenced the different behavior between studies.

Changes in the polyphenol profile during *in vitro* digestion of the supplement were confirmed by HPTLC (Figure 5). In the undigested samples, two faint bands can be identified at $R_f = 0.10$ and 0.12 (blue and brown, respectively). The blue-colored band can be attributed to ellagic acid, previously detected by this method [29]. In addition, in the zone of low R_f values, a blue color is visible, which may indicate the presence of phenolic acids, e.g., chlorogenic. In samples taken after the intestinal phase of digestion, an additional intense blue band appeared at $R_f = 0.45$ – 0.49 . This may indicate the release of additional phenolic compounds from the matrix due to digestive processes. Polyphenolic compounds are bound to protein structures in tissues; therefore, as a result of loosening their structures, they can be released in the course of digestion.

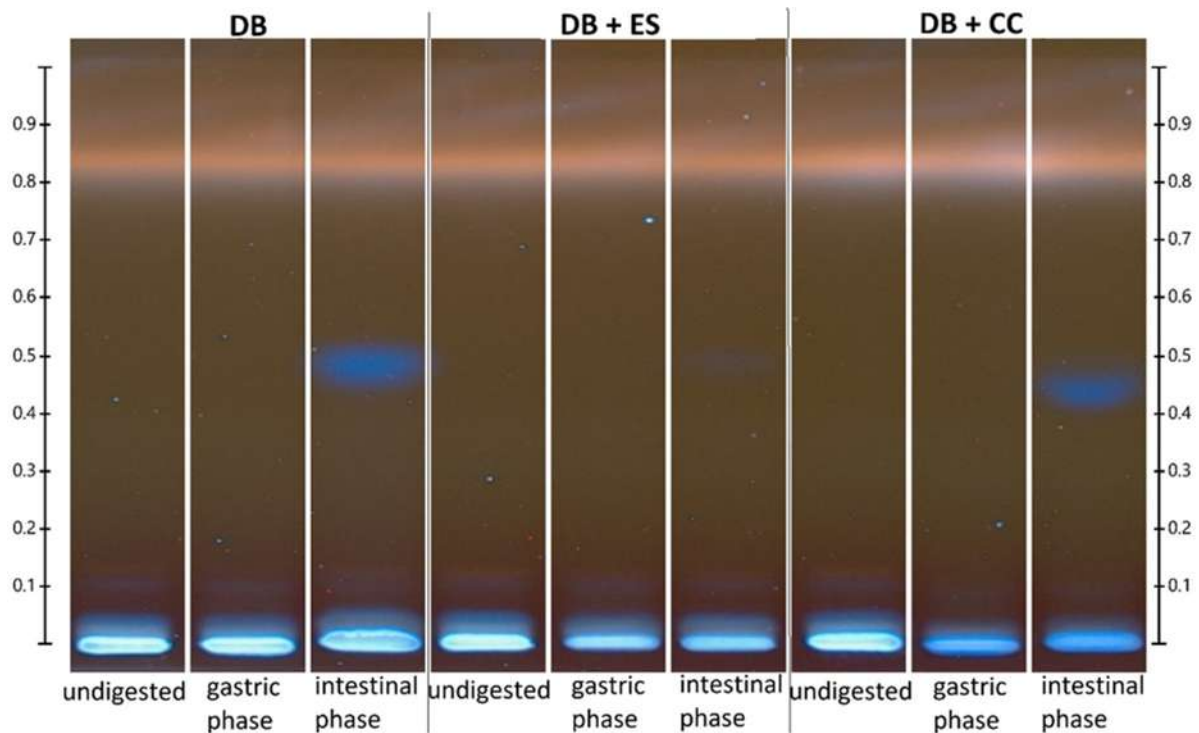


Figure 5. The change of the polyphenolic profile of prepared supplements DB + ES and DB + CC during in vitro digestion.

4. Conclusions

The novel dietary supplement composed of drone brood enriched with organic calcium was designed. For the first time, the bioaccessibility in vitro of the main components (steroid hormones, calcium, proteins, and polyphenols) from pure drone brood compared to designed supplements was demonstrated. A higher bioaccessibility of calcium from eggshells than from calcium carbonate was found, which is in line with literature data. It was shown that the proposed combination (drone brood with eggshells) increases the bioaccessibility of important compounds of drone brood, including hormones, polyphenols, and proteins which were rapidly digested into amino acids. This indicates a beneficial synergistic interaction between both components. However, bioaccessibility studies constitute the initial stage of the in vitro evaluation of the pharmacological potential of the proposed two-component supplement. The next step must include the assessment of bioavailability. Finally, before the recommendation of the designed preparation in the prevention/symptom relief of osteoporosis, the confirmation of its effectiveness and dose-related toxicity during in vivo studies are required. However, in the case of a positive result, the use of drone brood for the production of dietary supplements could expand the range of products offered by beekeeping and increase the income of beekeepers.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/app13084687/s1>. Figure S1. Microbiological purity of organic and caged eggshells. Figure S2. Exemplary microscopic images of microorganisms grown from inoculation of egg shells, where: (a) Gram-positive bacteria with a spherical shape, aggregated in clusters, microorganisms resemble bacteria of the *Streptococcus* family; (b) Gram-positive, rod-shaped bacteria most likely of the genus *Bacillus*, streptococci also visible; (c) Gram-positive bacteria with a spherical shape, clustered together, probably bacteria of the *Streptococcus* family. The presence of yeast cells has also been demonstrated.

Author Contributions: Conceptualization, M.D. and E.S.; methodology, M.D., E.S. and M.T.; software, E.S.; validation, E.S. and M.M.; formal analysis, M.D.; investigation, E.S., M.T. and M.M.; resources, E.S.; data curation, E.S.; writing—original draft preparation, E.S.; writing—review and editing, M.D. and M.T.; visualization, M.M.; supervision, M.D.; project administration, M.D.; funding acquisition, M.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the University of Rzeszów (research project PB/ZCHTZ/2023).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Rutka, I.; Galoburda, R.; Galins, J.; Galins, A. Bee Drone Brood Homogenate Chemical Composition, Stabilization and Application: A Review. *Res. Rural Dev.* **2021**, *36*, 96–103. [\[CrossRef\]](#)
2. Kędzia, B.; Hołderna-Kędzia, E. *Mniej Znane Produkty Pszczele*; Sądecki Bartnik: Stróże, Poland, 2017; pp. 58–89.
3. Sawczuk, R.; Karpińska, J.; Miltyk, W. What do we need to know about drone brood homogenate and what is known. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *245*, 111581. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Burmistrova, L. Physico-Chemical and Biological Appreciation of Drone Brood. Ph.D. Thesis, Ryazan Medical University, Ryazan, Russia, 1999. (In Russian).
5. Wyszynska, M.; Kabała-Dzik, A.; Szaflarska-Stojko, E. Observations on the hepatoprotective effect of DNA extract from bee brood. *Farm. Przegł. Nauk.* **2008**, *4*, 21–23.
6. Kabała-Dzik, A.; Smagacz, O.; Marquard, W. Shielding effect of bee brood in relation to embryotoxic compounds-acetylsalicylic acid. *Proc. Sci. Beekeep. Conf.* **2007**, *44*, 138–139. (In Polish)
7. Meda, A.; Lamien, C.E.; Millogo, J. Therapeutic uses of honey and honeybee larvae in central Burkina Faso. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *95*, 103–107. [\[CrossRef\]](#)
8. Osnicewa, L.A.; Efanowa, N.W.; Kabyszewa, W.W. Homogenate of drone in the diet of dogs. *Beekeeping* **2009**, *10*, 50–51. (In Ukrainian)
9. Bielajew, W.A.; Safonowskaja, J.W. Adaptogenic relationship training based on drone brood. *Beekeeping* **2009**, *6*, 51–52. (In Russian)
10. Peters, B.S.E.; Martini, L.A. Nutritional aspects of the prevention and treatment of osteoporosis. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **2010**, *54*, 179–185. [\[CrossRef\]](#)
11. Becheva, M.; Taneva, D. Prevention and treatment of osteoporosis. *Pharmacia* **2020**, *67*, 181–185. [\[CrossRef\]](#)
12. Prentice, A. Diet, nutrition and the prevention of osteoporosis. *Public Health Nutr.* **2004**, *7*, 227–243. [\[CrossRef\]](#)
13. Pouresmaeili, F.; Kamilidehghan, B.; Kamarehei, M.; Goh, Y.M. A comprehensive overview of osteoporosis and its risk factors. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2018**, *14*, 2029–2049. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Canarella, R.; Barbagallo, F.; Condorelli, S.A.; Aversa, A.; La Vignera, S.; Calogero, A.E. Osteoporosis from an endocrine perspective: The role of hormonal changes in the elderly. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1564. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Quattrini, S.; Pampaloni, B.; Gronchi, G.; Giusti, F.; Brandi, M.L. The Mediterranean Diet in Osteoporosis Prevention: An Insight in a Peri- and Post-Menopausal Population. *Nutrients* **2021**, *13*, 531. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Martiniakova, M.; Babikova, M.; Omelka, R. Pharmacological agents and natural compounds: Available treatments for osteoporosis. *J. Physiol. Pharmacol.* **2020**, *71*, 307–320.
17. Oh, S.-M.; Chung, K.-H. Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. *Life Sci.* **2004**, *74*, 1325–1335. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Chiodini, I.; Bolland, M.J. Calcium supplementation in osteoporosis: Useful or harmful? *Eur. J. Endocrinol.* **2018**, *178*, D13–D25. [\[CrossRef\]](#)
19. Rovenský, J.; Stancíková, M.; Masaryk, P.; Svik, K.; Istok, R. Eggshell calcium in the prevention and treatment of osteoporosis. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* **2003**, *23*, 83–92.
20. Brun, L.R.; Lupo, M.; Delorenzi, D.A.; Di Loreto, V.E.; Rigalli, A. Chicken eggshell as suitable calcium source at home. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2013**, *64*, 740–743. [\[CrossRef\]](#)
21. Shahnaila, A.S.; Pasha, I.; Iftikhar, H.; Mehak, F.; Sultana, R. Effects of eggshell powder supplementation on nutritional and sensory attributes of biscuits. *Czech J. Food Sci.* **2022**, *40*, 26–32. [\[CrossRef\]](#)
22. Ray, S.; Kumar Barman, A.; Kumar Roy, P.; Kumar Singh, B. Chicken eggshell powder as dietary calcium source in chocolate cakes. *Pharma Innov. J.* **2017**, *6*, 1–4.
23. Dolińska, B.; Jelińska, M.; Szulc-Musiół, B.; Ryszka, F. Use of eggshells as a raw material for production of calcium preparations. *Czech J. Food Sci.* **2016**, *34*, 313–317. [\[CrossRef\]](#)
24. Bartter, J.; Diffey, H.; Yeung, Y.H.; O’Leary, F.; Häslner, B.; Maulaga, W.; Alders, R. Use of chicken eggshell to improve dietary calcium intake in rural sub-Saharan Africa. *Matern. Child Nutr.* **2018**, *14*, e12649. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

25. Aditya, S.; Stephen, J.; Radhakrishnan, M. Utilization of eggshell waste in calcium-fortified foods and other industrial applications: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *115*, 422–432. [[CrossRef](#)]
26. Sakai, S.; Hien, V.T.T.; Tuyen, L.D.; Duc, H.A.; Masuda, Y.; Yamamoto, S. Effects of eggshell calcium supplementation on bone mass in postmenopausal Vietnamese women. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2017**, *63*, 120–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Omelka, R.; Martiniakova, M.; Svik, K.; Slovak, L.; Payer, J.; Oppenbergerova, I.; Kovacova, V.; Babikova, M.; Soltesova-Prnova, M. The effects of eggshell calcium (Biomin H[®]) and its combinations with alfacalcidol (1 α -hydroxyvitamin D3) and menaquinone-7 (vitamin K2) on ovariectomy-induced bone loss in a rat model of osteoporosis. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2021**, *105*, 336–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Vitali, D.; Dragojević, I.V.; Šebečić, B. Effects of incorporation of integral raw materials and dietary fibre on the selected nutritional and functional properties of biscuits. *Food Chem.* **2009**, *114*, 1462–1469. [[CrossRef](#)]
29. Sidor, E.; Mišek, M.; Zaguła, G.; Bocian, A.; Džugan, M. Searching for Differences in Chemical Composition and Biological Activity of Crude Drone Brood and Royal Jelly Useful for Their Authentication. *Foods* **2021**, *10*, 2233. [[CrossRef](#)]
30. Rodriguez-Rodriguez, E.; Navia Lomban, B.; Lopez-Sobaler, A.M.; Ortega Anta, R.M. Review and future perspectives on recommended calcium intake. *Nutr. Hosp.* **2010**, *25*, 366–374.
31. Carbonell-Capella, J.M.; Buniowska, M.; Barba, F.J.; Esteve, M.J.; Frigola, A. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13*, 155–171. [[CrossRef](#)]
32. Corraud, J.; Berger, J.; Cristol, J.P.; Avallone, S. Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during in vitro digestion. *Food Chem.* **2013**, *136*, 871–877. [[CrossRef](#)]
33. Kusumi, N.; Nakamura, M.; Tando, Y.; Suda, T.; Kudo, K. Egg-shell calcium solubility in stomach. *Jpn. J. Nutr. Assess.* **1999**, *16*, 291–296.
34. Kobus-Cisowska, J.; Szymanowska-Powałowska, D.; Szymandera-Buszka, K.; Rezler, R.; Jarzębski, M.; Szczepaniak, O.; Marciniak, G.; Jędrusek-Golińska, A.; Kobus-Moryson, M. Effect of fortification with calcium from eggshells on bioavailability, quality, and rheological characteristics of traditional Polish bread spread. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 6918–6929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Meiron, O.E.; Bar-David, E.; Aflalo, E.D.; Shechter, A.; Stepensky, D.; Berman, A.; Sagi, A. Solubility and bioavailability of stabilized amorphous calcium carbonate. *J. Bone Miner. Res.* **2011**, *26*, 364–372. [[CrossRef](#)]
36. Sharp, M.; Dohme, B.V. Stable Formulations of Testosterone Undecanoate. CN106456782B, 18 February 2020.
37. Baltacı, A.K.; Mogulkoc, R.; Baltacı, S.B. The role of zinc in the endocrine system. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2019**, *32*, 231–239.
38. Cauley, J.A. Estrogen and bone health in men and women. *Steroids* **2015**, *99*, 11–15. [[CrossRef](#)]
39. Humphries, K.H.; Gill, S. Risks and benefits of hormone replacement therapy: The evidence speaks. *CMAJ* **2003**, *168*, 1001–1010.
40. Kosum, N.; Yucel, B.; Kandemir, C.; Taskin, T.; Duru, M.E.; Kucukayadin, S.; Margaoan, R.; Cornea-Cipcigan, M. Chemical Composition and Androgenic Effect of Bee Drone Larvae (Apilarnil) for Goat Male Kids. *Chem. Biodivers.* **2022**, *19*, e202200548. [[CrossRef](#)]
41. Kistanova, E.; Zdoroeva, E.; Nevitov, M.; Nosov, A.; Vysokikh, M.; Sukhanova, I.; Vishnyakova, P.; Abadijeva, D.; Ankova, D.; Rashev, P.; et al. Drone brood fed supplement impacts on the folliculogenesis in growing gilts. *Vet. Arh.* **2020**, *90*, 583–592. [[CrossRef](#)]
42. Abdelouahab, N.; Nabila, B.; Roza, S.; Slimane, B.; Dako, E.; Pascal, A.; Mouloud, B.M. Molecular weight determination of a protease extracted from *Mucor pusillus*: Comparison methods. *Food Nutr. Sci.* **2015**, *6*, 348–354.
43. Hui, T.; Tang, T.; Gu, X.; Yuan, Z.; Xing, G. Comparison on Protein Bioaccessibility of Soymilk Gels Induced by Glucono- δ -Lactone and Lactic Acid Bacteria. *Molecules* **2022**, *27*, 6202. [[CrossRef](#)]
44. Margaoan, R.; Marghitas, L.A.; Dezmirean, D.S.; Bobis, O.; Bonta, V.; Catana, C.; Urcan, A.; Muresan, C.I.; Margin, M.G. Comparative Study on Quality Parameters of Royal Jelly, Apilarnil and Queen Bee Larvae Triturate. *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca Anim. Sci. Biotechnol.* **2017**, *74*, 51–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Seraglio, S.K.T.; Valesse, A.C.; Daguer, H.; Bergamo, G.; Azevedo, M.S.; Nehring, P.; Gonzaga, L.V.; Fett, R.; Costa, A.C.O. Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds, minerals, and antioxidant capacity of *Mimosa scabrella* Benth honeydew honeys. *Food Res. Int.* **2017**, *99*, 670–678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Delmas, D.; Hichami, A.; Rebe, C.; Ghiringhelli, F. Immunomodulation and Anti-inflammatory Roles of Polyphenols as Anticancer Agents. *Anti-Cancer Agents Med.* **2012**, *12*, 852–873.
47. Zhang, Z.; Li, X.; Sang, S.; McClements, D.J.; Chen, L.; Long, J.; Jiao, A.; Jin, Z.; Qiu, C. Polyphenols as Plant-Based Nutraceuticals: Health Effects, Encapsulation, Nano-Delivery, and Application. *Foods* **2022**, *11*, 2189. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

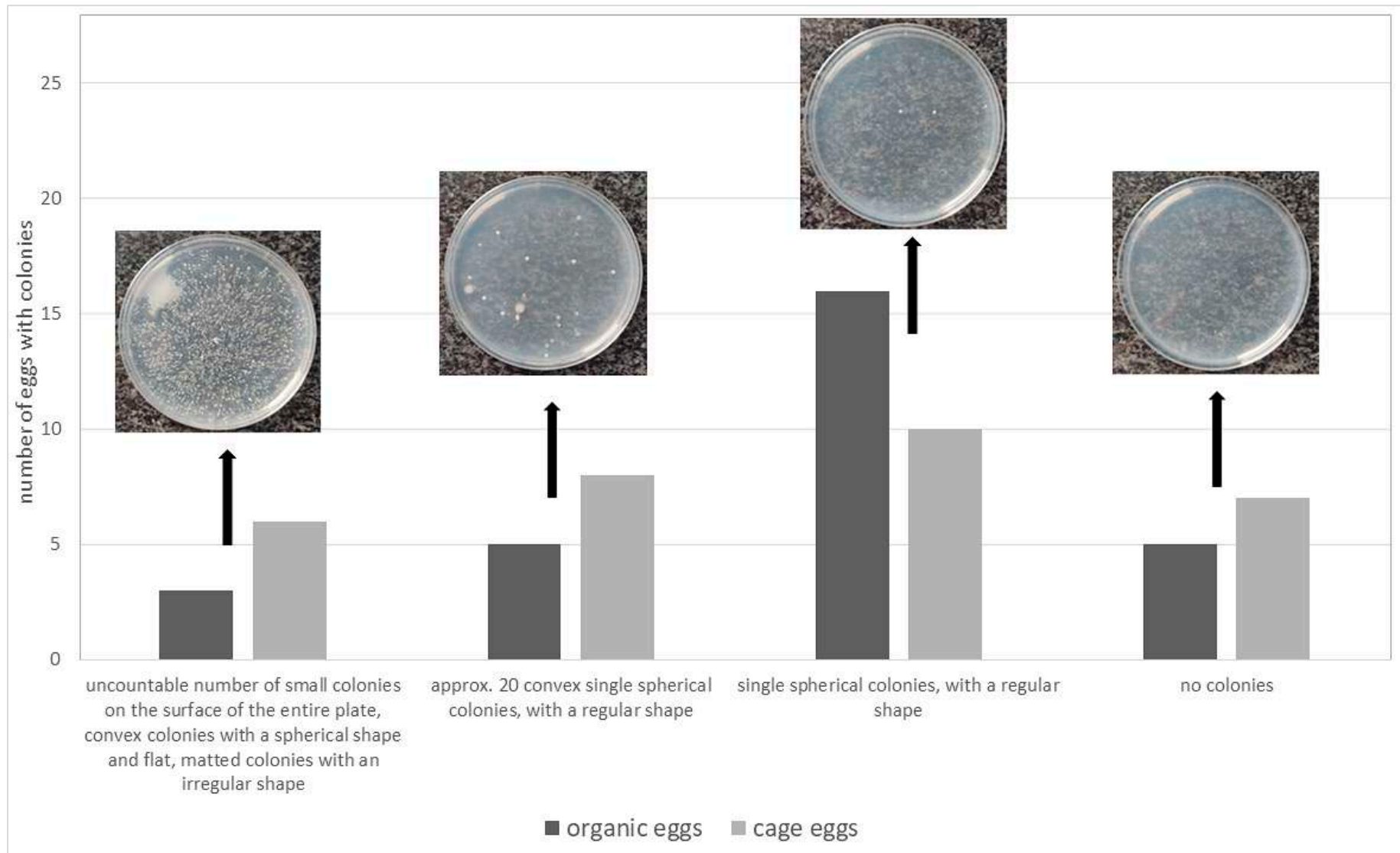


Figure S1. Microbiological purity of organic and caged eggshells

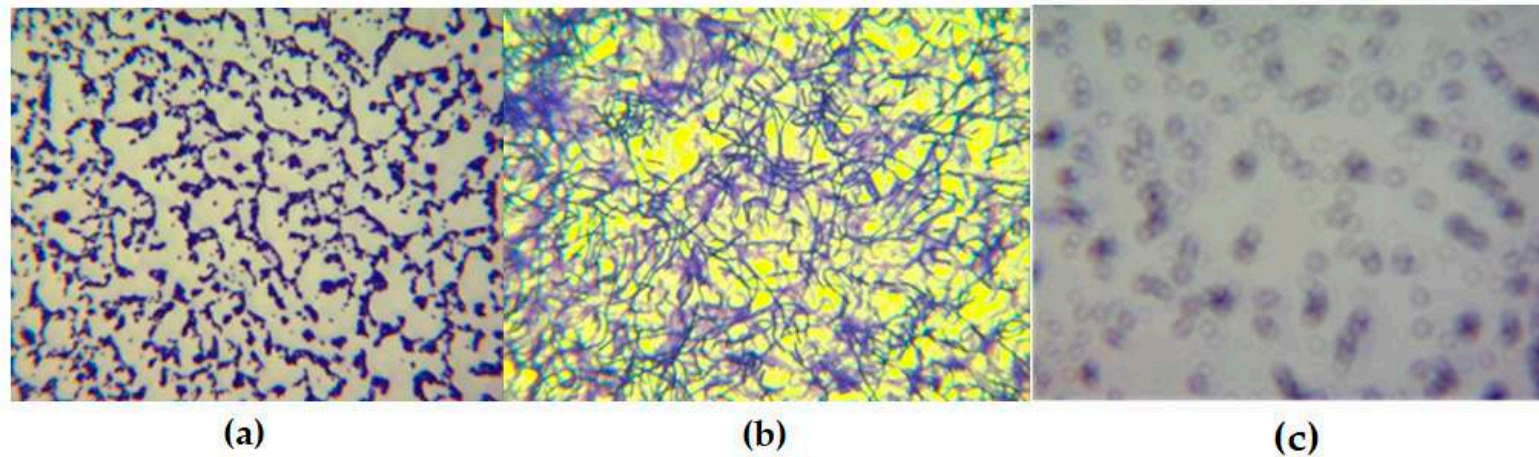


Figure S2. Exemplary microscopic images of microorganisms grown from inoculation of egg shells, where: (a) Gram-positive bacteria with a spherical shape, aggregated in clusters, microorganisms resemble bacteria of the *Streptococcus* family; (b) Gram-positive, rod-shaped bacteria most likely of the genus *Bacillus*, streptococci also visible; (c) Gram-positive bacteria with a spherical shape, clustered together, probably bacteria of the *Streptococcus* family. The presence of yeast cells has also been demonstrated.