

Programul PN II: PARTENERIATE ÎN DOMENII PRIORITARE

Tip proiect: PCCA 2013

Cod contract: PN-II-PT-PCCA-2013-4-0333

Număr contract: 183 /01.07.2014

Perioada de derulare: 01.07.2014 – 30.09.2017

Unități implicate:

Coordonator **Statiunea de Cercetare Dezvoltare pentru Viticultura si Vinificatie Iasi**

Partener 1 **Academia Română - Filiala Iași**

Partener 2 **Institutul de Cercetari Biologice Iasi Filiala a INCDSB Bucuresti**

Partener 3 **SC Cotnari SA**

TEHNOLOGIE DE VALORIFICARE A COMPONENTELOR BIOACTIVE DIN DEȘEUL DE SEMINȚE DE STRUGURI CU UTILITATE ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ, FARMACEUTICĂ, PROTECȚIA PLANTELOR ȘI A MEDIULUI (ACRONIM: PROVITIS)

RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL

INTRODUCERE

Creșterea producției de vin în multe state, a condus și la acumularea unor cantități impresionante de deșeu organic și anume a tescovinei, care mult timp nu a fost valorificată profitabil, fiind în special compostată sau depozitată în platforme, în ariile de producție, cauzând probleme mediului înconjurător.

Semințele de struguri, un subprodus al deșeurilor de tescovină, prin numeroase studii s-a demonstrat că reprezintă o sursă bogată în ulei și compuși fenolici. Uleiul de semințe de struguri, obținut prin presarea la rece, are calități deosebite datorită conținutului în acizi grași polinesaturați (80 - 95 %) și antioxidanți naturali care includ fitosteroli, tocoferoli, tocotrienoli, flavonoide, acizi fenolici și carotenoide (Fernandes și colab., 2012). Aceste componente din uleiul vegetal au efecte benefice pentru consumatori, acționând pozitiv în diverse boli cronice și anume diabet, risc coronarian (Iso și colab., 2002), procese inflamatorii (Calder și colab., 2009) și arteroscleroză.

În condiții de stres plantele produc metaboliți secundari pentru menținerea statusului sănătos. În această categorie intră și compușii fenolici. Semințele de struguri conțin aproximativ 60 - 70% din totalul compușilor fenolici extractibili, fiind o sursă importantă în acizi fenolici, compuși fenolici monomerici, oligomerici și proantocianidine (PA) condensate polimerice (taninuri). PA condensate polimerice sunt cei mai abundenți compuși fenolici din semințele de struguri (Baoshan și colab., 2011; Kahnal și colab., 2009).

În literatura de specialitate sunt numeroase raportări privind proprietățile biologice active ale compușilor fenolici și anume antibacteriană, antifungică, anticancerigenă, antivirală, antiinflamatorie și antioxidantă. Astfel, a crescut interesul pentru valorificarea din deșeurile de semințe de struguri a compușilor fenolici folosindu-se metode inovative de extracție, cu solvenți eficienți, care au condus la obținerea unor biopreparate oligomerice pure utilizate în industria farmaceutică, cosmetică și industria alimentară.

În modelul experimental din cadrul tehnologiei de valorificare a componentelor bioactive din deșeul de semințe de struguri, s-au propus activități de cercetare care au urmărit valorificarea atât a uleiului cât și a proantocianidinelor condensate polimerice insolubile în apă obținute din extractul polifenolic total. Preparatul purificat de proantocianidine condensate polimerice insolubile în apă s-a utilizat ca material de bază în tratamentul fizico chimic cu peroxid de oxigen, pentru obținerea bioprodusului natural cu proprietatea de solubilizare în apă, oferind posibilitatea valorificării proprietăților biologic active antibacteriene și antifungice ale acestuia în diferite industrii farmaceutică, cosmetică, alimentară, precum și în agricultură în protecția plantelor. De asemenea, în cadrul unor modele experimentale adecvate cercetărilor de farmacodinamie preclinică s-a evidențiat potențialul antioxidant, cicatrizant, antineoplazic și imunomodulator al bioprodusului, care se poate valorifica în alimentația funcțională ca supliment nutritiv.

Reziduul vegetal rezultat din extracțiile uleiului și a compușilor fenolici poate fi utilizat ca îngrășământ organic în fertilizarea solului.

Pentru realizarea obiectivelor propuse partenerii din consorțiu, pe lângă personalul calificat în diferite domenii (chimie, biochimie, biologie, microbiologie, biologie celulară, protecția plantelor, viticultură, vinificație) au avut în dotare o infrastructură de cercetare științifică specifică pentru obținerea rezultatelor scontate.

OBIECTIVELE GENERALE ȘI SPECIFICE REALIZATE

Conform operațiunilor derulate în modelul experimental s-au realizat următoarele obiective generale:

- ✓ obținerea uleiului din semințe de struguri;
- ✓ prepararea unui bioprodus natural fungicid și bactericid;
- ✓ valorificarea reziduului vegetal rezultat din extracțiile uleiului și a compușilor fenolici, ca fertilizator organic natural.

În planul de realizare a obiectivelor generale al proiectului au fost prevăzute 4 etape anuale.

În fiecare etapă s-au rezolvat, conform activităților de cercetare, următoarele obiective specifice:

- 1) Elaborarea modelului experimental privind tehnologia de valorificare a componentelor bioactive din deșeul de semințe de struguri.
- 2) Selectarea din tescovină a semințelor de struguri, condiționare și depozitare.
- 3) Obținerea uleiului din semințele de struguri aparținând soiului Fetească neagră, condiționarea și caracterizarea fizico - chimică.
- 4) Stabilirea, la nivel de laborator a condițiilor optime ale procesului de extracție etapizată a compușilor fenolici din deșeul de semințe delipidat; concentrarea extractului polifenolic cumulat; extracția lichid/lichid a proantocianidinelor condensate (PA) polimerice brute; purificarea preparatului brut de PA polimerice condensate; condiționarea sub formă de pulbere insolubilă în apă a preparatului purificat.
- 5) Determinarea randamentului de extracție a polifenolilor la nivel de laborator și micropilot, precum și a cantității de preparat purificat de PA condensate/kg deșeu de semințe delipidat.
- 6) Stabilirea condițiilor optime de fracționare a lanțurilor polimerice proantocianidinice din preparatul purificat PA în tratamentul fizico - chimic cu peroxid de oxigen pentru inducerea proprietății de solubilizare în apă distilată a bioprodusului obținut.
- 7) Evaluarea activității antibacteriene a bioprodusului față de tulpinile rezistente la antibiotice *Staphylococcus aureus* și *Escherichis coli*, precum și activitatea antifungică față de tulpinile

Botrytis cinerae izolate din plantațiile unității CO.

- 8) Evaluarea *in vitro*, pe culturi de celule renale normale Vero, a potențialului citotoxic și citostatic al uleiului natural și al unor extracte polifenolice primare, obținute din semințele de struguri.
- 9) Evidențierea și aprecierea semnificației unor proprietăți biologice ale unor produse proantocianidinice finale fracționate la nivel de laborator și micropilot, extrase și separate etapizat în condiții specifice din deșeurile de semințe de struguri.
- 10) Screeningul *in vitro* și *in vivo* al unor efecte farmacodinamice (antioxidante, cicatrizante, antitumorale și imunomodulatoare) ale uleiului, extractului proantocianidinic nehidrosolubil precursor și bioprodusului natural hidrosolubil.
- 11) Cuantificarea activității enzimelor de protecție celulară contra stresului oxidativ în culturile celulare Vero și HeLa sub acțiunea bioproduselor biologice active.
- 12) Testarea *in vivo*, pe animale sănătoase și respectiv purtătoare de carcinosarcom Walker 256, a proprietății antioxidante a extractelor polifenolice, după stabilirea dozei letale 50 (DL50).
- 13) Investigarea efectelor cicatrizante și antineoplazice ale produselor finite obținute în micropilot; evaluarea acțiunii imunomodulatoare a preparatelor biologice active testate.
- 14) Evaluarea semnificației chimioterapice antioxidantă, antitumorală, cicatrizantă și imunomodulatoare a bioproduselor finite, prin compararea eficienței lor cu potențialul specific unor agenți chimioterapici standard, de uz clinic;
- 15) Inițierea unor cercetări de farmacotoxicologie asupra produsului polifenolic natural final, fracționat, hidrosolubil farmacodinamic activ *in vivo*.
- 16) Demonstrarea calității de îngrășământ organic a rezidului vegetal rezultat din procesele extractive ale uleiului și a compușilor fenolici în procesele experimentale.
- 17) Întocmirea documentației de brevetare (cerere brevet nr. A/11758/2017 cu titlu *Metoda de purificare și procedeu de extracție a proantocianidinelor condensate polimerice din semințele de struguri pentru obținerea unui bioprodus natural*)
- 18) Diseminarea rezultatelor obținute prin publicare de articole științifice și participare la simpozioane, congrese.

Toate obiectivele generale și activitățile prevăzute în obiectivele specifice din planul de realizare au fost realizate integral.

GRADUL DE ATINGERE A REZULTATELOR

Modelul experimental al tehnologiei de valorificare a componentelor bioactive din deșeurile de semințe de struguri s-a elaborat pe baza documentației efectuate pentru soluționarea unor aspecte tehnice de execuție a unor operațiuni, în concordanță cu activitățile științifice efectuate.

Operațiunile din modelul experimental (schema 1) s-au desfășurat într-o succesiune logică, oferind posibilitatea finalizării obiectivelor generale și a obiectivelor specifice activităților de cercetare propuse în planul de realizare din proiect.

În modelul experimental, prima activitate a fost selectarea semințelor de struguri din tescovină pentru a asigura cantitatea necesară de material vegetal. Această etapă a fost precedată de extracția uleiului, din semințele de struguri, rezultând totodată și deșeurile de semințe de struguri delipidate și măcinate. În următoarele operațiuni de prelucrare a deșeurilor delipidate, în procesele extractive etapizate cu alcool 96% s-au obținut extractele polifenolice I, II și III, extractul polifenolic cumulat și extractul polifenolic concentrat. În procesul de extracție lichid/lichid cu eter dietilic, din extractul polifenolic concentrat, s-a obținut preparatul brut de PA condensate polimerice în stare solidă. Acest

precipitat brut de PA condensate polimerice a fost purificat, folosind o metodă simplă bazată pe proprietatea de insolubilizare în apă distilată.

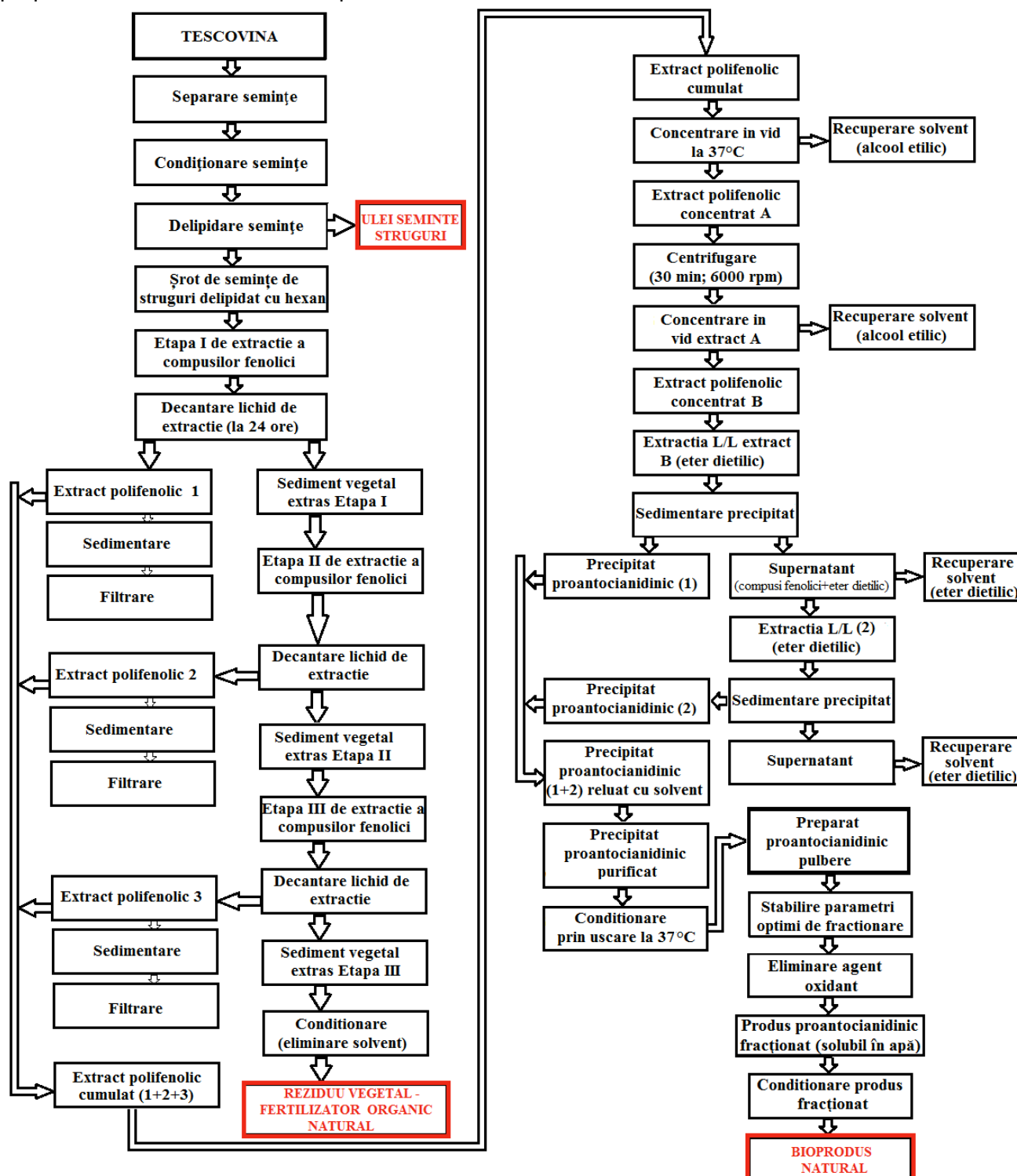


Fig. 1. Schema generală a tehnologiei de valorificare a componentelor bioactive din deșeurile de semințe de struguri

Pentru valorificarea preparatului purificat de PA condensate polimerice insolubile în apă a fost necesară inducerea acestei proprietăți, care s-a realizat prin fracționarea lanțurilor polimerice de PA

condensate cu un agent oxidant, peroxid de oxigen, în condiții optime de temperatură și timp de contact al reactanților, condiții care au condus astfel, la obținerea bioprodusului natural cu multiple proprietăți biologice.

Rezultatele practice obținute în modelul experimental au fost:

- 1) Obținerea **uleiului din semințele de struguri**
- 2) Obținerea **bioprodusului natural**, solubil în apă
- 3) Valorificarea reziduului vegetal ca **îngrășământ organic** în fertilizarea solului.

Este necear de subliniat că această tehnologie, bazată pe modelul experimental, nu utilizează solvenți toxici, iar solvenții rezultați din procesele extractive sunt recuperați în proporție de 85 - 88%, cu posibilitatea de reutilizare în ciclurile extractive al deșeurii de semințe delipidat, fără a afecta randamentele de extracție.

Obținerea uleiului. În procesul de extracție a uleiului, prin metoda de presare la rece, datorită durtății semințelor de struguri sunt necesare prese performante. Randamentul în ulei extras, din semințele de struguri, cu această metodă nu este de 100%, astfel, pentru prelucrarea deșeurii de semințe în procesele de extracție a compușilor fenolici a fost necesară și delipidarea cu solvent hexan. Randamentul final în ulei obținut din semințele de struguri aparținând soiului Fetească neagră a fost de 8 litri/100 kg semințe. Cantitatea de ulei obținută prin presare la rece, a fost condiționată prin decantare gravitațională și filtrare, urmată de repartizarea în flacoane din sticlă brună. Din punct de vedere organoleptic și ale caracteristicilor fizico - chimice, uleiul din semințe de struguri obținut s-a încadrat în categoria uleiurilor alimentare vegetale comestibile. În procesul de extracție a uleiului a rezultat deșeu delipidat de semințe de struguri sub formă de pulbere.

În cadrul obiectivelor specifice activităților de cercetare privind stabilirea raportului optim solid/lichid (cantitate deșeu delipidat/volum alcool etilic 96%) în procesul de extracție a compușilor fenolici s-au utilizat, la nivel de laborator, semințe de struguri colectate din plantațiile viticole ale CO. Au fost stabilite 5 raporturi S/L de la 1/4 la 1/8. Extracțiile s-au efectuat la 30°C timp de 12 ore în două etape de extracție. Din analiza rezultatelor obținute privind cantitatea totală de polifenoli (CFT), exprimată în g GAE/100 g deșeu delipidat de semințe, s-a constatat că valorile au fost de 2,19 g GAE la raportul solid/lichid 1/4 și 2,34 g GAE la raportul 1/8. Diferența nefiind marcantă între valorile determinate s-a ales raportul 1/4 S/L, care este rentabil din punct de vedere economic și a fost utilizat și de alți autori (Nawaz și colab., 2006). Rezultatele obținute au condus la concluzia că nu au fost suficiente două etape de extracție și timpul de 12 ore pentru extracția compușilor fenolici. Acest raport solid/lichid a fost experimentat și în cazul deșeurii de semințe delipidat aparținând soiului Fetească neagră din plantațiile cofinanțatorului, menținând temperatura la 30°C, însă timpul de extracție a fost de 24 ore, în trei etape extractive. De acest aspect s-a ținut cont în experimentele extractive efectuate ulterior în care s-a utilizat cantitatea de 1 kg deșeu de semințe delipidat la nivel de laborator și 3,0 kg deșeu la nivel de micropilot. Pentru demonstrarea reproductibilității valorilor totale de compuși fenolici (CFT) în extracția etapizată, atât la nivel de laborator cât și micropilot, experimentele au fost efectuate în trei repetiții. Astfel, valorile CFT la nivel de laborator au fost cuprinse între 42,884 g GAE/kg și 43,627 g GAE/kg deșeu de semințe delipidat, iar la nivel de micropilot între 45,561 g GAE/ kg și 45,995 g GAE/kg deșeu de semințe delipidate.

Extractele I, II și III conform operațiilor etapizate de extracție, care se succed în modelul experimental, au fost cumulate și concentrate în vid, etapă în care s-a recuperat 85 - 87% din alcoolul etilic utilizat.

Din extractul polifenolic concentrat s-a obținut preparatul brut de PA condensate polimerice,

prin precipitarea cu eter dietilic. Preparatul brut de PA a fost purificat printr-o metodă simplă, bazată pe proprietatea de insolubilizare în apă a PA condensate polimerice. Cantitățile de preparat purificat de PA insolubil în apă au fost cuprinse între 29 g și 31 g/kg deșeu delipidat, atât la nivel de laborator cât și micropilot

Obținerea bioprodusului natural

Preparatul purificat de PA condensate polimerice a constituit materialul de bază pentru obținerea bioprodusului natural solubil în apă distilată, condiție importantă pentru a putea fi valorificat. Inducerea proprietății de solubilizare în apă s-a realizat prin tratamentul fizico - chimic cu agentul oxidant peroxid de oxigen. În acest proces s-au determinat condițiile optime de fracționare a lanțurilor polimerice proantocianidinice, menținându-se constantă cantitatea de preparat PA purificat și variind cantitatea de agent de oxidare, temperatura și timpul de contact al reactanților. Din acest tratament, după eliminarea agentului oxidant la 40°C a rezultat bioprodusul natural, în stare solidă, sub formă de cruste friabile de culoare brun gălbuie.

Monitorizarea procesului de tratament fizico - chimic s-a efectuat prin aprecierea solubilizării în apă, determinarea cantității totale de compuși fenolici, spectrofotometric, în cazul soluțiilor preparate în apă distilată și prin metoda UHPLC a compușilor fenolici predominanți, a căror peak-uri a permis identificarea și cuantificarea acestora exprimată în mg/g bioprodus sau milivali/g bioprodus. De asemenea, s-a determinat activitatea antioxidantă (AA%) a bioprodusului.

În funcție de inducerea solubilizării în apă a bioprodusului, a valorilor totale de polifenoli și ale activității antioxidante s-au stabilit condițiile optime de tratament și anume: 2,5 g agent oxidant/1 g preparat purificat de PA condensate polimerice în condiții de temperatură de 67,5°C, timp de 45 minute. Bioprodusele obținute în aceste condiții la nivel de laborator și micropilot au fost solubile în apă și au avut o concentrație totală în polifenoli cuprinsă între 0,629 și 0,700 mg GAE /mg bioprodus și valori ale activității antioxidante (%) cuprinse între 89 și 91%/100 μg bioprodus.

Determinarea proprietăților biologice active ale bioprodusului natural

După descoperirea grupelor importante de antibiotice, în timp eficacitatea acestora a scăzut datorită creșterii proprietăților de rezistență a microorganismelor față de aceste medicamente. Produsele naturale ar putea constitui surse noi de molecule bioactive cu proprietăți antimicrobiene. Cercetări numeroase s-au axat asupra extractelor din plante, respectiv uleiuri esențiale, metaboliți secundari puri ca potențiale surse antimicrobiene.

Obiectivul proiectului s-a înscris în această direcție de cercetare urmărind prin valorificarea PA condensate polimerice, din deșeu de semințe delipidat, obținerea unui bioprodus natural cu proprietăți antibacteriene.

Evaluarea activității antimicrobiene a bioprodusului obținut s-a efectuat *in vitro* în condiții standardizate privind inoculul, mediu de cultură, timpul și temperatura de incubare a microorganismelor test. În studiu efectuat s-au testat două specii de microorganisme rezistente la antibiotice și anume *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*.

Din analiza datelor obținute, în domeniul de concentrații al bioprodusului de la 1,0 mg/mL la 5,0 mg/mL mediu lichid Muller Hinton cu densitatea inoculului de 10^5 celule/mL, s-a constatat că bioprodusul este mai reactiv față de specia Gram pozitivă *Staphylococcus aureus*, valoarea concentrației minime inhibitorii (CMI) fiind de 1,5 mg/mL și a concentrației minime bactericide (CMB) de 2,0 mg/mL. Activitatea antibacteriană față de specia *Escherichia coli* Gram negativă a fost moderată, valorile determinate (CMI) și (CMB), în ordine au fost 2,0 mg/mL și 3,0 mg/mL. Acest efect a fost constatat și de alți autori în cazul testării extractelor totale polifenolice sau a unor compuși

fenolici puri izolați din extractele polifenolice din semințele de struguri testate față de aceleași specii de microorganisme.

Activitatea antifungică a bioprodusului s-a determinat pe culturi pure de *Botrytis cinerea* izolate din plantațiile de struguri ale SCDVV Iași. Studiile s-au efectuat *in vitro* asupra inhibării dezvoltării radiale a miceliului și a inhibării germinării sporilor față de trei tulpini de *Botrytis cinerea*. Rezultatele obținute în experimentele efectuate au condus la concluzia că bioprodusul natural are activitate antifungică în special în inhibarea germinării sporilor de *Botrytis cinerea*. Concentrația CE₅₀ mg bioprodus/mL mediu PAD, cu efect de inhibare a germinării sporilor de *Botrytis cinerea* a variat în cazul tulpinilor testate BC₅, BC₆ și BC₈, fiind cuprinse între 1,1 mg/mL mediu PAD și 1,54 mg/mL mediu PAD.

Această proprietate antifungică a bioprodusului este foarte importantă deoarece limitează extinderea infecției cu agentul patogen. De asemenea, produsul nefiind toxic poate fi utilizat ca agent de control al infecției cu *Botrytis cinerea* chiar și în perioada de maturare a strugurilor, blocând germinarea sporilor și prin aceasta dezvoltarea miceliului care conduce la putrezirea strugurilor, perioadă în care tratamentul cu antifungice sintetice nu se efectuează datorită toxicității acestora. Prin inhibarea germinării sporilor, bioprodusul poate fi utilizat și în conservarea strugurilor, și de ce nu a altor legume și fructe pe parcursul transportului și a păstrării în depozite până la comercializare.

În obiectivele specifice 8 - 15 prevăzute, complementare și interdependente ale partenerului 2 (ICB filiala Iași) s-a estimat în funcție de bioprodusele obținute pe parcursul proceselor extractive influența acestora asupra:

- ✓ reactivității citofiziologice a celulelor normale Vero și tumorale Hela cu impact asupra dezvoltării culturilor celulare;
- ✓ investigarea *in vitro* a intensității procesului de generare metabolică a diferitelor specii reactive ale oxigenului (SRO);
- ✓ reactivitatea celulară a enzimelor stresului oxidativ, evaluarea proteinosintezei și a viabilității celulare;
- ✓ decelarea comportamentului procesului de apoptoză celulară și de menținere a integrității materialului genetic celular în condițiile tratamentului cu uleiul extras la rece din semințele boabelor de struguri și respectiv cu agenții polifenolici extrași din deșeurile delipidate;
- ✓ evaluarea *in vivo* a acțiunilor antioxidante (pe animale sănătoase sau respectiv purtătoare de carcinosarcom Walker 256), antineoplazică (șobolani purtători de tumora Walker 256);
- ✓ de stimulare a regenerării reparațiilor tegumentare (șobolani sănătoși cu leziuni tegumentare induse mecanic);
- ✓ de stimulare a sistemului imunitar al organismului și de mobilizare a efectorilor imunitari de tip celular și umoral de către produșii proantocianidinici etanol solubili precursori și respectiv produșii polifenolici finali, fracționați hidrosolubili, obținuți atât în condiții de laborator cât și de micropilot;
- ✓ compararea potențialului bioactiv al produșilor polifenolici obținuți cu cel al unor agenți chimioterapeutici standard, de uz clinic;
- ✓ inițierea unor cercetări de farmacotoxicologie pe șobolani sănătoși (urmărirea dinamicii ponderostatului și a greutateii unor viscere cu importanță majoră în economia generală a organismului animal);
- ✓ înregistrarea tabloului hematologic și a unor parametri biochimici plasmatici etc.

Rezultatele experimentale, referitoare la comportamentul citofiziologic al culturilor celulare Vero, sănătoase și al culturilor celulare HeLa, neoplazice, la acțiunea bioproduselor testate (obținute la nivel de laborator și micropilot) relevă – prin prisma variațiilor cantitative ale speciilor reactive de O_2 , ale proteinelor totale, ale numărului de celule vii, moarte, preapoptotice și apoptotice, gradului de activitate a unor enzime aparținând sistemului celular de protecție antioxidantă, concentrațiilor procentuale ale ADN-ului din comete – interferența mai mult sau mai puțin implicantă ale acestora cu procesele de oxidoreducere, proteinosinteză, apoptoză celulară, procesele enzimatică, structura și funcția aparatului genetic nuclear. Această interferență s-a concretizat prin impact mai mult sau mai puțin semnificativ asupra viabilității celulare, proceselor metabolismului intermediar și energetic, dezvoltării culturilor celulare și integrității materialului genetic.

De subliniat, că reactivitatea celulară a fost diferențiată ca sens și intensitate, în funcție de agentul folosit în tratamentul *in vitro*, doza de tratament și de particularitățile morfologice, structurale, functionale și genetice ale celulelor din componența culturilor celulare. Astfel, semnalăm reactivitatea crescută a celulelor canceroase – cu semnificație citostatică și citotoxică, deci biomedicală, în cazul dozelor superioare ale bioproduselor testate și mai redusă a celulelor sănătoase. Acest aspect subliniază buna tolerabilitate terapeutică, potențialul citostatic crescut și mai puțin citotoxic al bioproduselor, exprimat prin interacțiunea cu mecanisme moleculare de modulare metabolică, de activare enzimatică a sistemului de protecție celulară antioxidantă, de stimulare a apoptozei, în condițiile conservării integrității materialului genetic celular.

Variațiile cantitative înregistrate, atât în condițiile experimentării *in vitro*, la nivel celulelor normale și tumorale, cât și *in vivo*, la nivelul plasmatic și tisular al șobolanilor Wistar sănătoși sau agresați de carcinosarcom, în activitatea unor enzime de răspuns (peroxidaza, "peroxidaze" lipidice generatoare a MDA, GPx, SOD) la stresul oxidativ intracelular indus de agenții proantocianidinici insolubili și respectiv polifenolici finali hidrosolubili, demonstrează fără echivoc inducerea unei modulări (în sens stimulator sau inhibitor, deoarece nu toate enzimele sunt reactive concomitent la acțiunea unui agent oxidant) a activității mecanismului enzimatic protector de către agenții studiați, sensul și amplitudinea lor fiind diferențiate în raport de tipurile de culturi celulare și de animale de experiență, de doza biopreparatelor proantocianidinice nehidrosolubile și polifenolice hidrosolubile finale, fracționate incluse în testare.

În general, sensul și amplitudinea activității unor enzime scavenger al SRO din arsenalul sistemului protector antioxidant celulară, atât în condițiile experimentării *in vitro*, pe culturi celulare sănătoase Vero și neoplazice HeLa, cât și *in vivo*, pe animale sanatoase sau cu tumoră, dovedesc proprietatea antioxidantă în special a bioprodusilor polifenolici fracționați finali hidrosolubili, dar și a preparatelor proantocianidinice precursoră (în mai mică măsură);

Injecția intraperitoneală a diferitelor doze unice de bioprodus (de la 250 până la 2000 mg/kg corp), șobolanilor Wistar sănătoși are consecințe diferite asupra capacității de supraviețuire, mărirea progresivă a dozelor corelându-se cu o scădere gradată a duratei de viață, valoarea DL_{50} stabilită fiind de 250 mg/kg corp, ceea ce include bioprodusul în categoria substanțelor, produselor naturale moderat toxice. În lumina acesteia, pe baza unor testări preliminare *in vivo* s-a optat pentru domeniul dozelor terapeutice de 1.0 - 5.0 mg/kgcorp/zi, pentru evaluarea farmacodinamică antioxidantă, antitumorală și imunomodulatoare, iar pentru testarea efectului cicatrizant s-a utilizat o soluție de 5 %.

Dinamica procesului de cicatrizare în cazul tratamentului topic cu bioprodusul natural testat argumentează capacitatea sa de a accelera vindecarea prin mecanisme tisulare care implică

reducerea inflamației, susținerea procesului de proliferare și maturare celulară, confirmând proprietatea acestuia de stimulare a procesului regenerativ tegumentar și un semnificativ efect antiseptic, care a împiedicat apariția unor infecții locale în absența folosirii soluțiilor antiseptice standard.

Analiza comparativă a valorilor indicilor de evaluare a acțiunii antitumorale (RTM de 44.7% și respectiv 48.2%, precum și valorile T/C de 0.55 și 0.52) cu cele standard impuse de programele internaționale, german și american, de referință pentru această primă fază a evaluării calitative a efectului antitumoral (RTM de minimum 35%; valori T/C de 0,54-0,64), atestă cu obiectivitate capacitatea de exprimare a proprietății farmacologice antineoplazice a bioprodusilor polifenolici fracționați hidrosolubili finali, chiar dacă relevanța și semnificația impactului tumorosupresor al agenților polifenolici testați este asigurată de doza de 45 mg/kg.corp. Efectul manifestat de bioprodusul polifenolic final are o dublă relevanță, atât de confirmare a unor semnalări ale literaturii de specialitate cât și de justificare pentru antamarea unor viitoare cercetări pentru caracterizarea farmacologică complexă a acestor agenți naturali ca potențiale chimioterapeutice cu posibilă valorificare și biomedicală.

Variațiile numerice și procentuale ale leucocitelor și ale diferitelor subspecii leucocitare, induse de tratamentul cu bioprodusele naturale, atestă în special capacitatea produsului polifenolic fracționat, hidrosolubil, final de micropilot de a interveni ca imunomodulator al reacțiilor de apărare imună de tip celular.

Variațiile cantitative ale proteinemiei, albuminemiei, globulinemiei, complexelor imune circulante au demonstrat inducerea unei imunostimulări de tip umoral, asemănătoare și uneori inferioară ca eficiență rodilemidului, confirmând, completând și aprofundând, ce-i drept parțial în acest moment, valențele imunomodulatoare ale bioprodusului atât ca agent cu acțiune stimulatorie asupra imunității de tip umoral, cât și de tip celular menționată mai sus.

Aprecierea comparativă a eficienței chimioterapiei antioxidante, antitumorale, cicatrizante și imunomodulatoare a bioprodusului testat cu cea corespunzătoare unor agenți medicamentoși standard, de uz clinic - în ordinea efectelor farmacodinamice menționate: vitamina E, 5-fluorouracil, etopozid, metotrexat, ciclofosfamida, Dermofarm, Cicatrol și respectiv rodilemid - condiționează sublinierea certă a bioprodusului ca fiind un agent chimioterapeutic cu valențe antioxidante, antitumorale, cicatrizante și imunomodulatoare, cu un potențial farmacodinamic similar, inferior și chiar superior medicamentelor de uz clinic luate ca referință, care atrage atenția asupra posibilei sale importanțe biomedicale, în special în tratamente de tip asociativ.

Dovezile experimentale ale studiilor de farmacotoxicologie, furnizate de urmărirea dinamicii ponderostatului în decursul diferitelor chimioterapii experimentale; variația greutăților diverselor viscere (inimă, ficat, rinichi, plămâni, splină, pancreas și timus), comparativ cu valorile martor; evaluarea tabloului hematologic; dozarea unor parametri biochimici plasmatici, raportate la valoarea DL50 a bioprodusului polifenolic fracționat, hidrosolubil, final de micropilot, la clasificarea substanțelor toxice, după Voicu, 1997 și Gossel et al., 1994, la clasificarea efectelor hematologice toxice ale unui tratament medicamentos dată de Organizația Mondială a Sănătății, includ produsul polifenolic autohton final de micropilot în categoria produselor naturale moderat toxice, ceea ce conferă acestuia un puternic atu pentru valorificarea biomedicală, farmaceutică și alimentară viitoare.

Ansamblul rezultatelor prezentate a constituit suportul factual folosit în caracterizarea bioprodusului polifenolic final de micropilot, fracționat și hidrosolubil ca agent bioactiv multifuncțional (cu valoare antioxidantă, imunomodulatoare, cicatrizantă, antitumorală), cu posibilă valorificare

biomedicală - în special în asociere cu medicamente de uz clinic - și alimentară ca supliment nutritiv polifuncțional în alimentația funcțională rațională.

Experimentarea rezidului vegetal rezultat din procesele extractive, ca îngrășământ natural în fertilizarea solului s-a realizat în parcele experimentale.

Microorganismele din sol au o capacitate remarcabilă de adaptare în procesele de biodegradare a compușilor organici naturali. Rezistența la atacul microbial în sol poate fi influențată fie de evoluția factorilor climatici din ecosistem, în special precipitațiile și temperatura, fie de structura chimică a compușilor organici. Cea mai mare parte a microorganismelor din sol preferă un pH apropiat de neutralitate. În ce privește temperatura microorganismele mezofile desfășoară activități metabolice numai în anumite limite de temperatură și umiditate. Apa din sol participă în toate procesele de creștere și multiplicare a microorganismelor fiind necesară nu numai ca element cu rol plastic, ci și ca factor care condiționează nutriția deoarece include majoritatea elementelor nutritive. Aceste condiții prezentate succint, au fost monitorizate pe parcursul experimentului în care s-a urmărit influența rezidului vegetal asupra populațiilor de microorganismele din grupele ecofiziologice implicate în biodegradarea substratelor organice din compoziția acestuia, care conține proteină (9,61 g%), celuloză (51,72 g%) și substanțe neazotate (34,80 g%).

Demonstrarea calității de îngrășământ organic a rezidului vegetal a impus efectuarea unui experiment preliminar care a oferit informații orientative privind cantitatea de reziduu care a fost administrată în sol în parcelele experimentale. Conform rezultatelor preliminare obținute, în câmp au fost organizate trei parcele experimentale: M martor (nefertilizat), V1 și V2 în care s-a administrat 1,5 kg/m² (V1), respectiv 3,0 kg/m² (V2) reziduu vegetal. Impactul rezidului administrat în sol s-a apreciat prin analize microbiologice determinându-se numărul de microorganismele exprimat în logaritmi în baza 2 din grupele ecofiziologice (amonificatoare, denitrificatoare, nitratbacterii, nitritbacterii, fixatoare de azot aerobe și anaerobe, proteolitice, celulozolitice aerobe și anaerobe) și biochimice prin determinarea enzimatică a dehidrogenazei actuală și potențială în sol, exprimată în mg formazan/g s.u. Analizele microbiologice s-au efectuat la 3, 6 și 12 luni, iar cele enzimatiche lunar. Experimentul s-a derulat în intervalul martie 2016 - martie 2017.

Rezultatele obținute în analiza microbiologică după 3 luni de zile de la administrarea rezidului vegetal în sol au evidențiat creșterea numerică a microorganismelor în grupele ecofiziologice comparativ cu martorul și anume: amonificatorii cu 18 % în V1 și 20% în V2, nitratbacteriile cu 22% în V1 și V2, nitritbacteriile cu 13% în V1 și 22% în V2, fixatoare de azot aerobe cu 13% în V1 și V2, fixatoare de azot anaerobe cu 24% în V1 și 33% în V2, proteolitice cu 21% în V1 și V2, celulozolitice aerobe cu 7% în V1 și 27% în V2, celulozolitice anaerobe cu 2% în V1 și 3% în V2. Creșterea numărului de microorganismele din grupele ecofiziologice, în parcelele experimentale, s-a datorat aportului de substrat metabolizabile din reziduu vegetal. Procesul de biodegradare a rezidului vegetal de către microflora existentă în sol a fost confirmată de creșterea numărului de microorganismele.

În următoarele luni de vară și toamnă, experimentul s-a desfășurat în condiții climatice severe, în care s-au înregistrat 53 zile cu temperaturi mai mari de 30°C și lipsa precipitațiilor ceea ce a condus la accentuarea deficitului de apă în sol de la 47% la 86%. Astfel, în luna septembrie numărul microorganismelor din grupele ecofiziologice a scăzut, menținându-se la valori mai mari comparativ cu martorul, doar în parcela V2. Aceste rezultate sugerează că aportul de substrat din reziduu vegetal a contribuit la menținerea, în condițiile climatice severe, a activității de biodegradare de către microorganismele rezistente.

La un an de la administrarea în sol a reziduuului vegetal, în martie 2017, din rezultatele obținute în analizele microbiologice s-a constatat că numărul de microorganisme amonificatoare, fixatoare de azot aerobe și celulozolitice anaerobe a fost egal în parcela martor și parcela V1, acesta crescând în ordine doar în parcela V2 cu 5,2%, cu 5,8% și 27%. În schimb numărul nitrit și nitratbacteriilor a crescut în ambele parcele experimentale cu 35% și respectiv 39%. Numărul egal de microorganisme din grupele ecofiziologice din parcela martor și V1 sugerează finalizarea biodegradării unor substraturi specifice din reziduu vegetal pentru aceste grupe ecofiziologice, deoarece în parcela V1 s-a administrat o cantitate mai mică de reziduu.

Creșterea valorică a numărului de microorganisme în parcela V2, unde cantitatea de reziduu administrată a fost cea mai mare, după un an sugerează că în solul din această parcelă experimentală există încă substraturi nemetabolizate în procesul de biodegradare, proces afectat de condițiile climatice severe din vară și toamnă.

Privite în ansamblu aceste rezultate confirmă posibilitatea utilizării reziduuului vegetal ca îngrășământ organic, fiind o sursă de substraturi metabolizabile pentru microorganismele implicate în circuitul azotului și carbonului. Rezultatele microbiologice s-au corelat cu rezultatele obținute în determinarea activității enzimatică dehidrogenazică actuală și potențială în solul parcelei martor și al parcelelor experimentale. Activitatea dehidrogenazică actuală determinată în solul parcelor experimentale a crescut cu 34% în V1 și cu 49% în V2, menținându-se la valori ridicate și după un an de la administrarea reziduuului vegetal în sol. Aceste rezultate susțin efectul pozitiv în biodegradarea reziduuului vegetal testat, fiind astfel posibil de utilizat ca un îngrășământ natural în procesul de fertilizare a solului. Atât numărul crescut de microorganisme din grupele ecofiziologice cât și valorile apropiate ale activității dehidrogenazică actuală și potențială susțin metabolizarea intensă a reziduuului vegetal în sol în condiții climatice normale.

Rezultatele activităților de cercetare desfășurate pe parcursul derulării proiectului au condus la elaborarea documentației de brevetare - cerere brevet nr. A/11758/2017 cu titlu *Metoda de purificare și procedeu de extracție a proantocianidinelor condensate polimerice din semințele de struguri pentru obținerea unui bioprodus natura*, autori Nechita Ancuța, Deleanu Constantin, Niculaua Marius, Mihai Cosmin, Filimon Răzvan, Pașa Rodica.

Diseminarea rezultatelor obținute cu caracter nebrevetabil s-a realizat prin publicarea de articole științifice și participarea la simpozioane, congrese.

Articole BDI publicate/acceptate la publicare:

1. Nechita C-tin. B., Niculaua M., Cotea V.V., 2015 - *Assessment and adaptation of methods of extraction of grape seed polyphenol compounds*. Lucrări Științifice Seria Horticultură Vol. 58, no.1., p 195 - 200, U.S.A.M.V. Iași. Editura "Ion Ionescu de la Brad" ISSN 1454-7376
2. Nechita Ancuța, Filimon R., Pașa Rodica, Damian Doina, Moroșanu Ana Maria, 2015 - *Preliminary results on establishment the optimal extraction conditions staged phenolic compounds in grape seed proanthocyanidins*. Lucrări Științifice Seria Horticultură Vol. 58, no. 2, p. 151 -156, U.S.A.M.V. Iași. Editura "Ion Ionescu de la Brad" ISSN 1454-7376.
3. Cosmin-Teodor Mihai, Gabriela Vochita, Daniela Gherghel, Rodica Pașa, Bogdan Nechita, Ancuta Nechita, Pincu Rotinberg, 2016 - *Mechanism of action of some new cytostatic/cytotoxic polyphenolic extracts from Vitis vinifera seeds*. Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza”, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară, XVII (3), pp: 107 - 112

4. Nechita Ancuța, Filimon R., Zaldea Gabi, Filimon Roxana, Damian Doina, Nechita C-tin. B., Pașa Rodica, 2017 - *Valuation of vegetal residue of grape seeds resulting from the extractive processes of phenolic compounds*. *Lucrări Științifice Seria Horticultură* Vol. 60, no.1., U.S.A.M.V. Iași. Editura "Ion Ionescu de la Brad" ISSN 1454-7376 (*acceptat la publicare*)
5. Nechita Ancuța, Alexandru C., Filimon R., Filimon Roxana, Damian Doina, Nechita C-tin. B., Pașa Rodica, 2017 - *Antimicrobial activity of an active biological bioproduct obtained from grape seeds*. *Lucrări Științifice Seria Horticultură* Vol. 60, no.1., U.S.A.M.V. Iași. Editura "Ion Ionescu de la Brad" ISSN 1454-7376 (*acceptat la publicare*)
6. Filimon V.R., Nechita Ancuța, Damian Doina, Pașa Rodica, Filimon Roxana, Băetu M., Mihai C.T., Niculaua M., 2017 - *Separation and characterisation of the main proanthocyanidin fractions of grape seed*. *Lucrări Științifice Seria Horticultură* Vol. 60, no.1., U.S.A.M.V. Iași. Editura "Ion Ionescu de la Brad" ISSN 1454-7376 (*acceptat la publicare*).

Articole ISI publicate/în curs de publicare:

7. Filimon V. Răzvan, Roxana M. Filimon, Ancuța Nechita, Marius M. Băetu, Liliana Rotaru, Cristina Arion, Antoanela Patraș, 2017 - *Assessment of quality characteristics of new Vitis vinifera L. cultivars for temperate climate vineyards*. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, vol 67, no. 5, pp. 405 - 415, factor de impact 0,769. <http://dx.doi.org/10.1080/09064710.2017.1285959>.
8. Gabriela Vochita, Cosmin-Teodor Mihai, Rodica Pașa, Bogdan Nechita, Ancuța Nechita, Pincu Rotinberg, Daniela Gherghel - *In vitro testing of a potential antitumor agent obtained from wastes of winemaking process*. *Romanian Biotechnological Letters (trimis spre evaluare)*.
9. Cotea V. V., Luchian C. E., Niculaua M., Tudose Sandu-Ville Șt., Moraru Ioan, Nechita C-tin Bogdan, 2017 - *Evaluation of Phenolic Compounds Content of Grape Marc, Environmental Engineering and Management*. *Journal*, ISSN: 1843 – 3707 (*trimis spre evaluare*).

Conferințe

1. Gherghel Daniela , Cosmin-Teodor Mihai, Gabriela Vochita, Pincu Rotinberg, Rodica Pasa, Ancuța Nechita, Bogdan Nechita - *Cytostatic and/or cytotoxic effects of some primary polyphenolic extracts obtained from the grapes seeds*. *Faculty of Biology Annual Scientific Meeting*, October 22 – 24, 2015, Iasi
2. Mihai Cosmin-Teodor, Gabriela Vochita, Daniela Gherghel, Rodica Pașa, Bogdan Nechita, Ancuța Nechita, Pincu Rotinberg - *Action mechanisms of some new polyphenolic extracts from seeds of Vitis vinifera*. October 22 – 24, 2015, Iasi.
3. Cotea V. V., Luchian C. E., Niculaua M., Tucaliuc R., Tudose-Sandu-Ville Șt., 2016 - *Evaluation of phenolic compounds content of grape marc*. 3rd International Conference on Chemical Engineering Romania ICCE, Iași, 09 – 11 November 2016, S2 - P10 p. 15
4. Cosmin-Teodor MIHAI, Gabriela Vochita, Daniela Gherghel, Pincu Rotinberg, 2016 - *Possible action mechanisms involved in expression of the in vitro cytostatic and cytotoxic impact of some fractionated proanthocyanidin products obtained from grape seeds*. *Book of Abstracts of The 12th National Symposium with International Participation „Medicinal Plants - Present and Perspectives”*, September 6-9, 52 – 53.
5. Cosmin-Teodor Mihai, Gabriela Vochita, Daniela Gherghel, Rodica Pașa, Ancuța Nechita,

Pincu Rotinberg, 2016 - *In vitro evaluation of cytotoxic impact of some proanthocyanidin fractions extracted from grape seeds*. Book of Abstracts of The 12th National Symposium with International Participation „Medicinal Plants - Present and Perspectives”, September 6-9, 52 – 53.

6. Cosmin-Teodor MIHAI, Gabriela Vochita, Daniela Gherghel, Rodica Paşa, Ancuța Nechita, Pincu Rotinberg, 2016 - *Investigation of antioxidant potential of some proanthocyanidin extracts obtained from Vitis vinifera seeds*. Faculty of Biology Annual Scientific Meeting, Iași, 20-22nd October 2016.
7. Cosmin-Teodor Mihai, Daniela Gherghel, Gabriela Vochita, P. Rotinberg, Ancuța Nechita, V.R. Filimon, V.V. Cotea - *Physico-chemical and biological characterization of black grape seeds oil obtained by cold mechanical pressing*. 40 th World Congress of Vine and Wine, Sofia, Bulgaria, 29.mai – 02.iunie.2017
8. Cosmin-Teodor Mihai, Gabriela Vochita, Pincu Rotinberg, Ancuta Vasile, Rodica Pasa, Razvan Filimon, Daniela Gherghel - *Impact assessment of a polyphenolic black grape extract on DNA integrity in normal and cancerous cells*. Al IX-lea Congres Național de Biologie Celulară și Moleculară cu participare internațională, Iași, 7-11 iunie 2017.

Toate obiectivele generale și specifice activităților de cercetare din planul proiectului au fost realizate. Gradul de atingere a rezultatelor estimate este prezentat în tabelul următor:

Nr. crt.	Rezultate	Grad de atingere
1	Model experimental privind tehnologia de valorificare a componentelor bioactive din deșeurile de semințe de struguri.	100 %
2	Extracția compușilor fenolici; obținerea preparatului brut de PA condensate	100 %
3	Obținerea preparatului de PA condensate purificat insolubil în apă	100 %
4	Obținerea bioprodusului natural biologic activ solubil în apă	100 %
5	Determinarea proprietăților biologice ale bioprodusului: antimicrobiană și antifungică;	100 %
6	Studiile <i>in vitro</i> pe culturi de celule normale sau tumorale și <i>in vivo</i> pe animale sănătoase sau purtătoare de tumoră, în cadrul unor modele experimentale adecvate cercetărilor de farmacodinamie preclinică pentru evidențiere și cuantificarea proprietăților antioxidante, cicatrizante, antineoplazice și imunomodulatoare ale bioprodusului natural	100 %
7	Demonstrarea calității de îngrășământ organic a rezidului vegetal rezultat din procesele extractive ale uleiului și a compușilor fenolici în procesele experimentale	100 %
8	Brevet	parțial (cerere brevet)

3. Impactul rezultatelor obținute

Valorificarea deșeurilor de semințe de struguri va conduce prin extracția uleiului la diversificarea gamei de produse vegetale cu impact asupra prețului de comercializare a produselor similare din import.

Extracția proantocianidinelor condensate polimerice (PA) și prelucrarea chimică cu un agent

oxidant și eliminarea ulterioară a acestuia, a condus la obținerea bioprodusului natural. Proprietatea de solubilizare în apă a bioprodusului are un impact pozitiv, favorizând valorificarea practică a acestuia:

- ✓ ca agent antioxidant natural în industria alimentară, reprezentând o alternativă pentru produsele antioxidante sintetice care sunt toxice;
- ✓ reactivitatea bioprodusului natural, testat singular, față de tulpinile bacteriene Gram pozitive și Gram negative, rezistente la antibiotice va atrage atenția specialiștilor în vederea asocierii cu antibiotice sau alte molecule bioactive naturale care prin efectul sinergic va mări bioreactivitatea antimicrobiană a bioprodusului, fiind posibil să se reducă dozele de antibiotice în tratamentele medicamentoase;
- ✓ proprietatea antifungică a bioprodusului de a inhiba germinarea sporilor de *Botrytis cinerea* conduce la diversificarea preparatelor naturale, în prezent în număr mic, în controlul biologic al infecției cu acest patogen. Acest bioprodus nu este toxic și poate fi utilizat preventiv și în perioade avansate de maturare a strugurilor comparativ cu produsele antifungice sintetice.

Ansamblul rezultatelor, obținute în condițiile unui autentic screening preclinic farmacodinamic, prin prisma ineditului bioprodusului polifenolic, final, fracționat autohton și original (în literatura de specialitate și în farmacopee nu se menționează existența și valorificarea unui asemenea fitopreparat natural) coperim caracterizarea sa preliminară ca fiind un fitopreparat polifuncțional cu acțiune antioxidantă, antitumorală, cicatrizantă și imunostimulatoare.

Prin prisma valorii DL_{50} (250 mg/kg.corp) și respectiv a clasificării efectelor hematologice toxice (asupra hematiilor și leucocitelor circulante) ale unui tratament medicamentos dată de Organizația Mondială a Sănătății și respectiv prin prisma categoriilor de toxicitate, pe baza variațiilor procentuale ale numărului mediu de eritrocite circulante, hemoglobinemiei, hematocritului – semnalate în condițiile chimioterapiei – apreciem că bioprodusul polifenolic final se include în categoria produselor naturale moderat toxice (0,5 – 5,0 g/kg.corp) și respectiv se încadrează în grupa 1 de toxicitate hematologică.

Aceste aprecieri de toxicologie demonstrează biocompatibilitatea unui eventual tratament polifenolic cu desfășurarea normală a proceselor fiziologice ale organismului animal.

Concluziv apreciem ca cercetările *in vitro*, pe culturi de celule normale sau tumorale și *in vivo*, pe animale sanatoase sau purtătoare de tumoră, în cadrul unor modele experimentale adecvate studiilor de farmacodinamie preclinică, au asigurat evidențierea și cuantificarea proprietăților antioxidante, cicatrizante, antineoplazice și imunomodulatoare ale bioprodusului polifenolic final, hidrosolubil, fracționat din precursorul proantocianidinic insolubil, care s-ar putea valorifica în domeniul biomedical, rezultatele noastre confirmând unele date din literatura de specialitate, pe care o îmbogățește.

Din considerentele mai sus menționate și în lumina eficienței chimioterapiei polifenolice antioxidantă, cicatrizantă, antitumorală și imunoterapică (de multe ori similară cu aceea a unor agenți standard de referință), apreciem oportunitatea și posibilitatea de valorificare practică a preparatului natural, obținut în final din deșeurile de semințe de struguri, preferențial în alimentația funcțională ca supliment nutritiv polivalent din punct de vedere farmacodinamic activ, cu valoare în fortificarea organismului animal și de ce nu și uman, dar și biomedical, mai puțin ca agent terapeutic singular și mai recomandabil, preferabil ca agent de asociere (în diverse asocieri terapeutice alături de chimioterapeutice de uz clinic) în tratamentul unor maladii, acest ultim mod de valorificare biomedicală și farmaceutică impunând investigații viitoare suplimentare preclinice și clinice

veterinare, respectiv umane.

Un alt rezultat important al proiectului îl constituie posibilitatea valorificării rezidului vegetal obținut în procesele extractive (ulei, compuși fenolici). Cantitativ din 100 kg deșeu de semințe de struguri prelucrat în procesele extractive, 90% reprezintă rezidul vegetal care poate fi valorificat în agricultură ca îngrășământ organic. Valorificarea acestuia are un impact foarte important constând în:

- ✓ reducerea cantității de deșeu în ariile de producție și implicit a efectelor poluante asupra mediului;
- ✓ starea fizică, sub formă de pulbere, lipsa uleiului, a compușilor fenolici cu proprietăți antimicrobiene, antifungice și compoziția în substraturi naturale (celuloză, proteină și substanțe neazotate) favorizează, în condiții climatice normale, decașarea cu ușurință a proceselor de biodegradare a rezidului vegetal, fapt susținut atât de creșterea numerică a populațiilor de microorganisme în sol cât și a activității dehidrogenazice actuală și potențială care în acest caz a prezentat valori apropiate, indicând intensitatea proceselor metabolice în sol în prezența rezidului;

Aceste rezultate conduc la concluzia că rezidul vegetal nu este poluant, este biodegradabil și poate fi utilizat ca îngrășământ organic în fertilizarea solului.

Cele mai bune rezultate ale proiectului sunt reprezentate de:

- ✓ obținerea **bioprodusului natural** cu utilitate în industria alimentară, farmaceutică, cosmetică și protecția plantelor;
- ✓ **tehnologia elaborată** pe baza modelului experimental, în care deșeurile de semințe de struguri este total valorificat prin extracția uleiului, a compușilor proantoacianidinici condensati polimerici (material de bază pentru obținerea bioprodusului natural) și valorificarea rezidului vegetal, în mod practic, ca îngrășământ organic natural;
- ✓ recuperarea în proporție de 85 - 88% a solvenților utilizați în procesele de extracție, cu posibilitate de reutilizare a acestora.

28.09.2017

Director proiect,
dr. ing. Ancuța NECHITA

BIBLIOGRAFIE

Baoshan Sun, Ricardo-Da-Silva, J.M., Spranger, M.Isabel, 2001 - *Quantificação das catequinas e proantocianidinas em algumas variedades de videira e vinhos tintos portugueses*. Ciência Téc. Vitiv. vol.16, n.1, pp.23-34. ISSN 0254-0223.

Calder PC., 2009 - *Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale*. Biochimie. vol 91(6), pp:791-5.

Fernandes Luana, Casal Susana, Cruz Rebeca; Pereira J. A., Ramalhosa Elsa, 2013 - *Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties*. Food Research International. ISSN 0963-9969. vol 50:1, p. 161–166.

Gossel Th. A. Douglas B.J., 1994 - *Principles of clinical toxicology*, Raven-Pres

Haseeb Nawaz, John Shi, Gauri S.Mittal, Yukio Kakudac, 2006 - *Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration*. Separation and Purification Technology. Volume 48, Issue 2, March 2006, pp: 176-181

Iso H, Sato S, Umemura U, Kudo M, Koike K, Kitamura A, Imano H, Okamura T, Naito Y, Shimamoto T., 2002 - *Linoleic acid, other fatty acids, and the risk of stroke*. Stroke. Journal Cerebral Circulation vol 33, pp :2086–2093

Khanal R. C., Howard,L. R., Prior R. L., 2009 - *Procyanidin content of grape seed and pomace, and total anthocyanin content of grape pomace as affected by extrusion processing*. Journal of Food Science, vol. 74, H174–H182.

Voicu V., 1997 - *Toxicologie clinică*, Edit. Albatros, București.