

**Programul PN II: PARTENERIATE ÎN DOMENII PRIORITARE**

**Tip proiect: PCCA 2013**

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

**Număr contract: 183 /25.08.2014**

**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)**

## **RST - RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC IN EXTENSO**

### **ETAPA DE EXECUȚIE 1/2014**

**Denumirea etapei: Modele experimentale utile demarării activităților de cercetare din proiect, metode specifice de caracterizare fizico-chimică și biologică a extractelor vegetale**

**Perioada de derulare: 01.07.2014 – 10.12.2014**

**Unități implicate:**

<b>Coordonator proiect</b>	<b>Statiunea de Cercetare Dezvoltare pentru Viticultura si Vinificatie Iasi</b>
<b>Partener 1</b>	<b>Academia Română - Filiala Iași</b>
<b>Partener 2</b>	<b>Institutul de Cercetari Biologice Iasi Filiala a INCDSB Bucuresti</b>
<b>Partener 3</b>	<b>SC Cotnari SA</b>

**Activități derulate conform planului de realizare al proiectului:**

Activitatea I.1. Elaborarea modelului experimental privind tehnologia de valorificare a componentelor bioactive din deșeul de semințe de struguri

Activitatea I.2. Selectarea semintelor de struguri din tescovină și efectuarea tratamentelor de condiționare și depozitare.

Activitatea I.3. Obținerea, condiționarea și caracterizarea fizico-chimică a uleiului din seminte de struguri

Activitatea I.4. Obținerea extractelor polifenolice brute

Activitatea I.5. Concentrarea în vid a extractelor brute polifenolice și caracterizarea fizico-chimică

Activitatea I.6 Stabilirea raportului optim material vegetal / volum solvent; a timpului optim de extracție etapizată a compușilor fenolici proantocianidinici.

Activitatea I.7 Determinarea condițiilor de fracționare ținând cont de cantitatea de proantocianidine/cantitatea de agenți de fracționare, timpii de contact, stabilirea temperaturii optime pentru realizarea fracționării

Activitatea I.8. Proprietatea antioxidantă a uleiului natural și a extractului proantocianidinic, produși separați succesiv, din semințele de struguri prin flowcitometria nivelului speciilor reactive de oxigen la nivelul diverselor culturi celulare tratate, comparativ cu cele martor.

Activitatea I.9. Proteinogeneza și viabilitatea celulară a culturilor de celule Vero, renale de maimuță, și a celulelor tumorale umane HeLa supuse acțiunii uleiului natural și a extractului proantocianidinic

Activitatea I.10. Comportamentul procesului de apoptoză celulară al culturilor celulare Vero și HeLa supuse acțiunii bioprodusului biologic activ obținut în condiții de laborator

Activitatea I.11. Determinarea grupelor ecofiziologice de microorganisme în loturile experimentale în vederea aprecierii calității de fertilizator a rezidului rezultat din procesele extractive.

Activitatea I.12. Intreținere loturi experimentale, recoltare și procesare struguri, selectare seminte de struguri.

## REZUMATUL ETAPEI

Proiectul cu titlul „*Tehnologie de valorificare a componentelor bioactive din deșeurile de semințe de struguri cu utilitate în industria alimentară, farmaceutică, protecția plantelor și a mediului*”, prin obiectivele propuse, se înscrie în eforturile depuse pe plan mondial în direcția valorificării deșeurilor rezultate în industria alimentară și a diminuării impactului negativ a acestora asupra mediului și a sănătății omului.

Rezultatele obținute în prima etapă a proiectului s-au concretizat în următoarele:

- ✓ tehnologie de valorificare a componentelor bioactive din deșeurile de semințe de struguri conform modelului experimental;
- ✓ deșeu de semințe de struguri bogat în ulei și compuși fenolici proantocianidinici;
- ✓ ulei din semințe de struguri, produs natural cu efecte benefice pentru sănătatea consumatorilor;
- ✓ extracte polifenolice brute;
- ✓ extracte polifenolice concentrate;
- ✓ stabilirea raportului optim material vegetal / volum solvent a timpului optim de extracție etapizată a compușilor fenolici la nivel de laborator;
- ✓ evidențierea și cuantificarea preliminară a impactului antioxidant a uleiului natural și a extractului polifenolic;
- ✓ determinarea impactului citostatic și citotoxic al uleiului și extractelor polifenolice;
- ✓ stabilirea impactului extractelor polifenolice și ale uleiului din semințele de struguri asupra procesului de apoptoză celulară;
- ✓ caracterizarea preliminară a biocenozelor prin determinarea grupelor ecofiziologice de microorganisme, în loturile martor și experimentale în vederea aprecierii calității de fertilizator a rezidului rezultat din procesele extractive.

Etapă I/2014 din cadrul proiectului a fost finalizată, toate obiectivele științifice și tehnice planificate fiind atinse.

Fiecare partener a avut un rol bine conturat și totodată complementar. În acest context, apreciem că rezultatele garantează continuarea cu succes a proiectului.

## DESCRIEREA ȘTIINȚIFICĂ ȘI TEHNICĂ, CU PUNEREA ÎN EVIDENȚĂ A REZULTATELOR ETAPEI ȘI GRADUL DE REALIZARE A OBIECTIVELOR

### Activitatea I.1. Elaborarea modelului experimental privind tehnologia de valorificare a componentelor bioactive din deșeurile de semințe de struguri

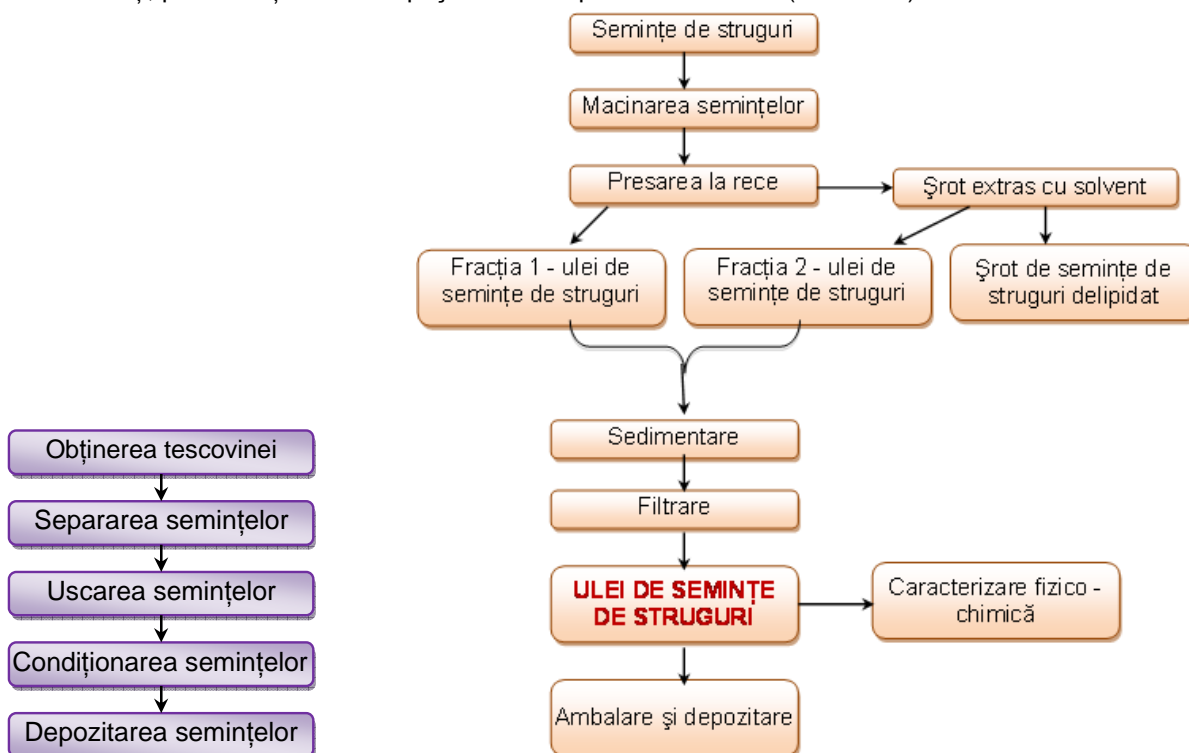
În contextul prezentării situației pe plan național și internațional privind deșeurile alimentare, precum și rezultate obținute privind extracția, purificarea și caracterizarea fizico-chimică a unor componente bioactive, evidențierea și cuantificarea potențialului bioactiv citostatic și/sau citotoxic, evidențierea și estimarea utilizării ca agent cicatrizant, a activităților antifungice și antibacteriene, au condus la elaborarea unei tehnologii de valorificare a componentelor bioactive din deșeurile de semințe de struguri, în cadrul unui model experimental.

Schemele din modelul experimental sunt în concordanță cu activitățile de cercetare din planul de lucru, propus în cele trei etape. Succesiunea operațiilor din modelul experimental este următoarea:

1. Obținerea tescovinei și separarea semințelor de struguri;
2. Extracția uleiului din semințe de struguri;
3. Experimentarea la nivel de laborator a metodei etapizate de extracție a compușilor fenolici;
4. Precipitarea compușilor fenolici proantocianidinici din extractul polifenolic brut concentrat;
5. Stabilirea parametrilor optimi de fracționare a compușilor polifenolici proantocianidinici;
6. Extracția etapizată a compușilor fenolici în condiții de micropilot;
7. Precipitarea compușilor fenolici proantocianidinici din extractul polifenolic brut concentrat și condiționarea preparatului proantocianidinic;
8. Verificarea parametrilor optimi de fracționare a produsului proantocianidinic în condițiile utilizării unor cantități mari de reactanți;
9. Caracterizarea fizico-chimică și a calității de fertilizator a deșeurilor de semințe de struguri rezultat din procesele extractive.

În cadrul primei operațiuni a modelului experimental se vor desfășura activitățile de prelucrare a strugurilor și obținerea tescovinei de către unitatea coordonatoare (CO) SCDVV Iași și cofinanțatoare S.C. Cotnari SA (P3). Personalul din ambele unități se va implica în operațiunile de selectare a semințelor de struguri în vederea asigurării cantităților necesare de semințe, pentru efectuarea activităților de cercetare la nivel de laborator și micropilot (schema 1).

Pentru obținerea compușilor fenolici, prin procese extractive cu solvenți, este obligatoriu separarea, în primul rând, a uleiului din deșeu de semințe. Astfel, în operațiunea 2 a modelului experimental, se va extrage uleiul din semințele de struguri, obținându-se totodată un deșeu delipidat, care va fi supus prelucrărilor ulterioare, în procese extractive cu solvenți, pentru obținerea compușilor fenolici proantocianidinici (schema 2).



**Schema 1 - Obținerea tescovinei și separarea semințelor de struguri.**

**Schema 2 - Extracția uleiului din semințele de struguri prin presare la rece**

Valorificarea compușilor fenolici din deșeu de semințe de struguri, în cadrul modelului experimental propus, va determina reducerea cantitativă a produselor chimice de sinteză în tratamentele efectuate în plantații și industria farmaceutică.

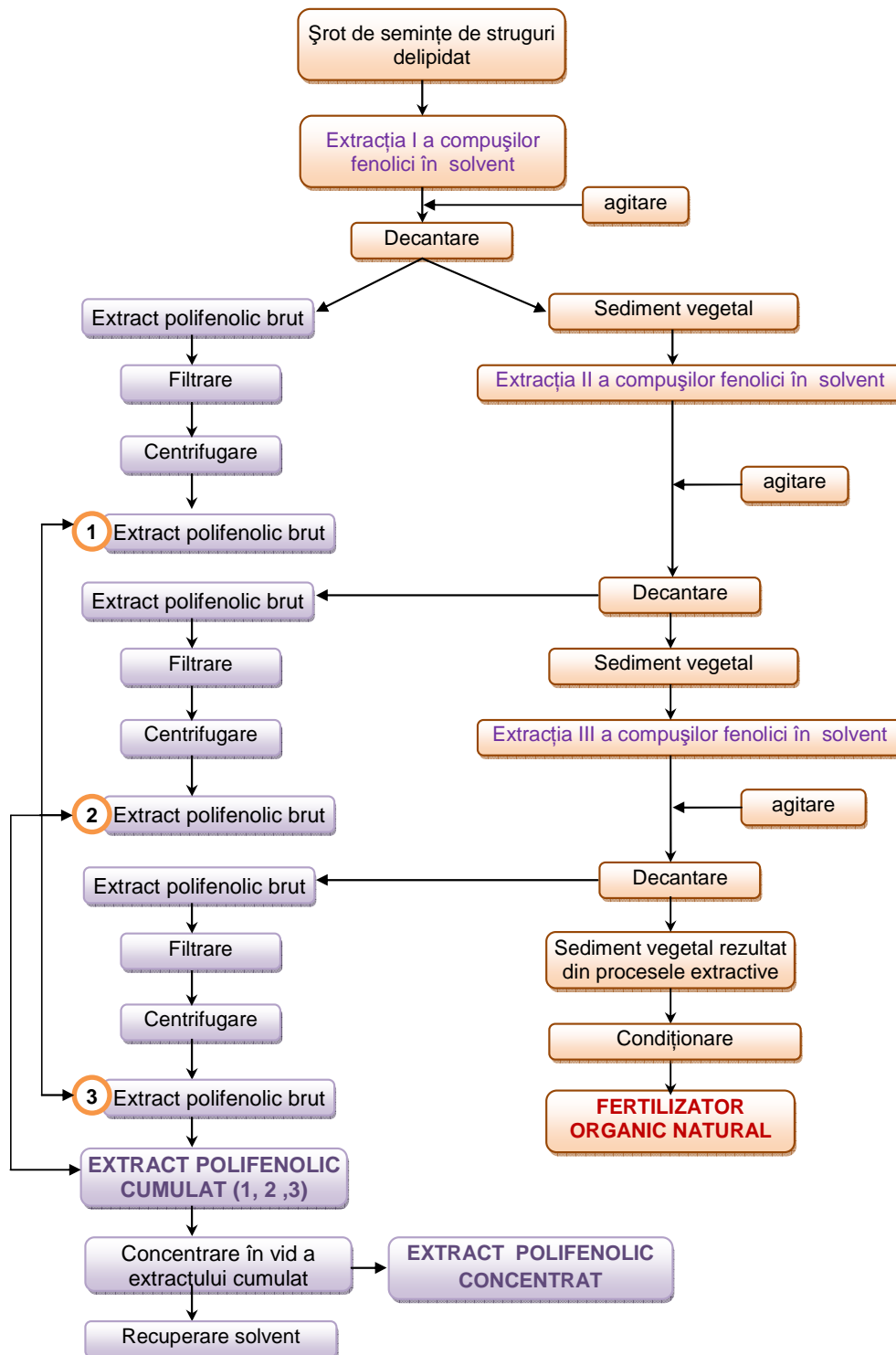
Activitățile de cercetare pentru realizarea acestui obiectiv vor demara cu un studiu preliminar privind compușii fenolici din extractele brute obținute din semințe prin metoda Soxhlet urmată de caracterizarea fizico-chimică a acestora de către partenerul P1 și biologică de către partenerul P2 pentru evaluarea potențialului antioxidant și a viabilității celulare a unor culturi celulare animale sau umane, normale sau tumorale, tratate cu extractele polifenolice și ulei din semințe de struguri rezultate în modelul experimental.

Operațiunile efectuate, conform schemei 3, includ derularea proceselor extractive a compușilor fenolici pe parcursul cărora vor fi executate proceduri de agitare, decantare, filtrare, centrifugare, concentrare a extractelor și recuperare a solventului utilizat. Colectivul unității CO va monitoriza procesele extractive, va analiza extractele brute fenolice și extractul brut fenolic concentrat folisind metode chimice spectrofotometrice specifice.

Conform procedurilor din schema 3 în final se va obține: extractul polifenolic concentrat și rezidul vegetal de semințe delipidat, din care s-au extras și compușii fenolici. Acest reziduu, după condiționare va fi caracterizat fizico-chimic, în vederea utilizării ca fertilizant organic natural. De asemenea, în această schemă de operațiuni va fi

recuperat solventul.

Echipa partenerului P2 va evalua preimarin în vitro reactivitatea celulară a diferitelor tipuri de celule animale și umane, normale și tumorale a extractelor polifenolice, pe variante experimentale, proceduri de laborator, investigând diferiți indici chimici, biochimici, fiziologici, farmacologici privind evidențierea, cuantificarea și semnificația eficienței proteice, antioxidante, a impactului citostatic și citotoxic.

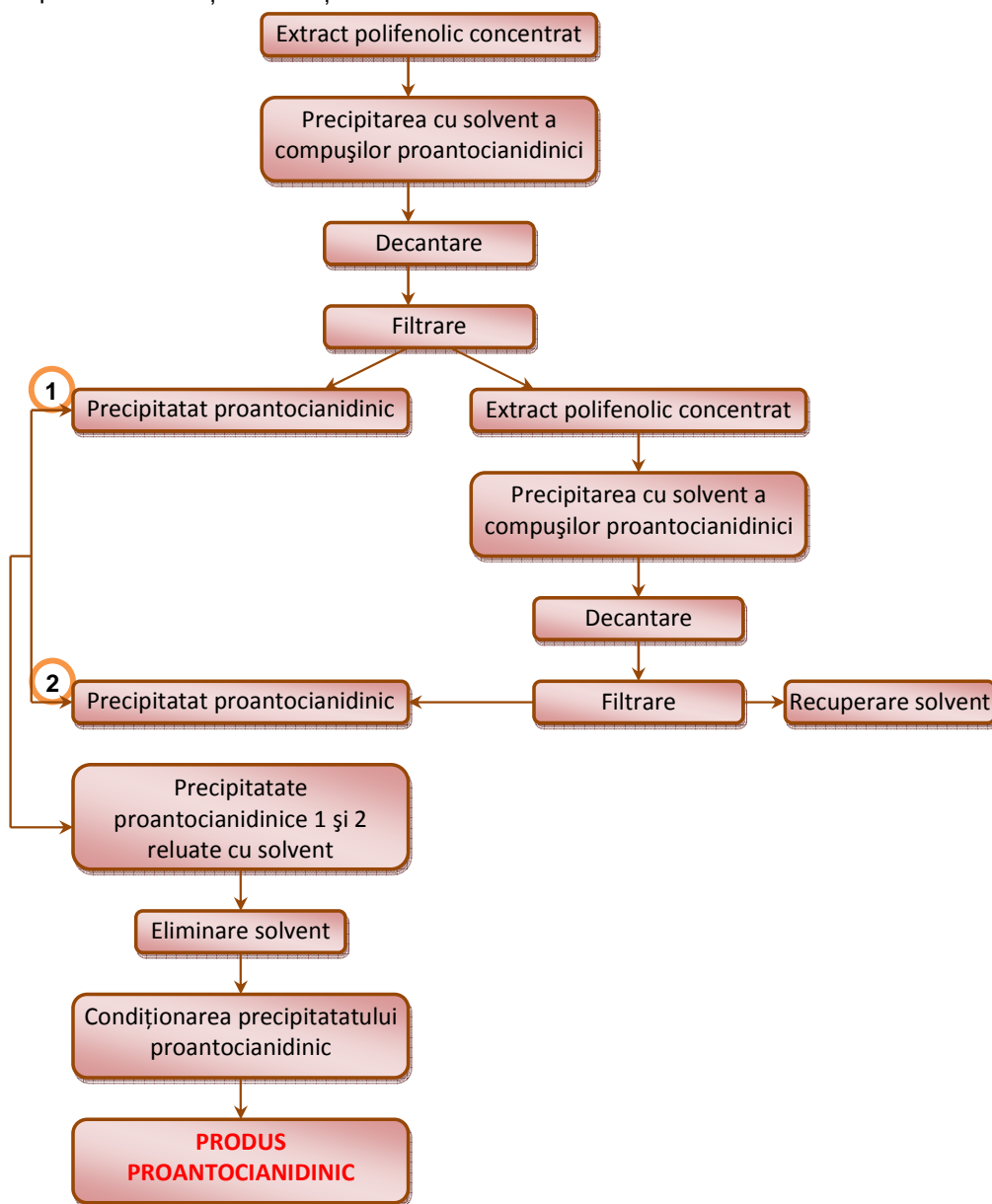


**Schema 3 - Extracția etapizată a compușilor fenolici din deșeurile de semințe de struguri delipidat**

Separarea compușilor fenolici proantocianidinici din extractul fenolic concentrat se poate realiza prin

precipitarea cu solvenți și anume cloroform (Cedric ș.a., 2001), eter de petrol (Sean X Liu ș.a., 2012) sau eter dietilic (Kulcečki V ș.a., 2007). În modelul experimental propus se va folosi eterul dietilic. Conform schemei 4 de lucru separarea compușilor fenolici proantocianidinici din extractul fenolic concentrat se va desfășura efectuându-se operațiuni succesive de precipitare, decantare, filtrare în una sau două etape. Precipitatele proantocianidinice obținute vor fi reunite, după filtrare cu alcoolul etilic, executându-se apoi eliminarea solventului și uscarea pînă la greutate constantă.

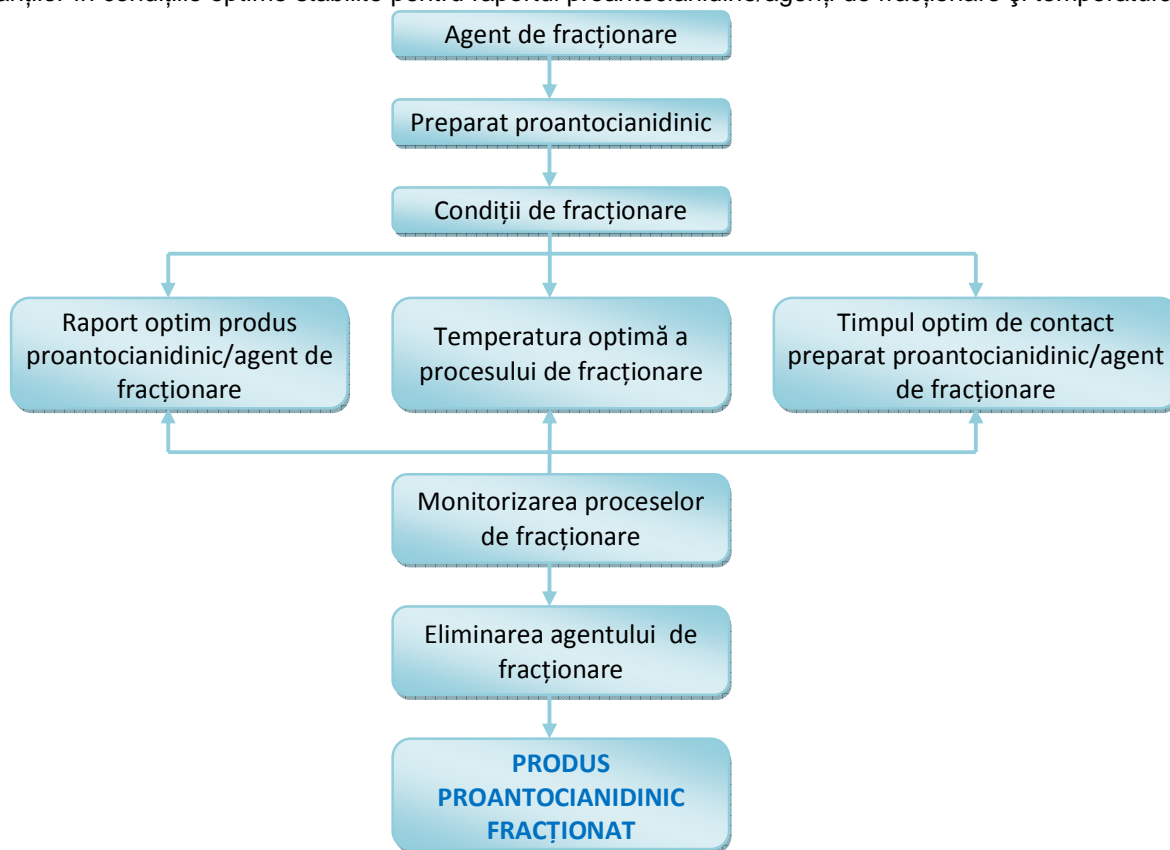
Pentru stabilirea condițiilor optime de precipitare a compușilor proantocianidinici va fi testat raportul optim volum extract fenolic concentrat/volum solvent, în ambele etape de precipitare propuse. Monitorizarea procesului de precipitare a compușilor fenolici din extractul fenolic concentrat se va efectua prin analiza extractelor fenolice rezultate după fiecare precipitare, determinându-se DO la 280 nm și determinarea polifenolilor totali prin metoda Folin Ciocâlțeu. Activitățile de cercetare propuse vor fi executate de către colectivul unității coordonatoare CO, care va încerca și recuperarea solvenților utilizați.



**Schema 4 - Precipitarea compușilor fenolici proantocianidinici din extractul polifenolic brut concentrat**

Schema 5 în care prezentăm operațiunile de fragmentare a compușilor proantocianidinici, la prima vedere,

pare simplă, însă se vor executa activitățile de cercetare pentru fiecare parametru implicat în acest proces complex. În acest sens se vor experimenta diferite rapoarte cantitative produs proantocianidinic/agent de fracționare, în vederea stabilirii raportului optim de reactanți. Se va determina temperatura optimă a procesului de fracționare, testându-se un domeniu de temperaturi. Va fi necesar, de asemenea, monitorizarea timpului de contact al reactanților în condițiile optime stabilite pentru raportul proantocianidine/agenți de fracționare și temperatură.



**Schema 5 - Stabilirea parametrilor optimi de fracționare a compușilor polifenolici proantocianidnici**

Procesul de fracționare a compușilor proantocianidnici va fi monitorizat de către colectivul coordonatorului de proiect și a partenerului P1 prin metode TLC și HPLC. Ultima operațiune efectuată în procesul de fracționare este eliminarea agentului de fracționare care, de asemenea, necesită experimentări în vederea obținerii în final a bioprodusului natural sub formă de pulbere.

Operațiunile efectuate la nivel de laborator vor fi reluate la nivel de micropilot pentru a verifica reproductibilitatea rezultatelor în contextul utilizării unor cantități mari de reactanți.

Șrotul de semințe rezultat din procesele extractive ale uleiului și compușilor fenolici va fi testat ca fertilizator organic. Procesul de biodegradare a deșeurii vegetale va fi apreciat prin determinarea grupelor ecofiziologice de microorganisme și anume: microflora aerobă totală, amonificatoare, nitrică, nitroasă denitrificatoare și celulozolică. Determinările microbiologice vor fi efectuate în lotul martor și în loturile experimentale în care va fi administrat fertilizatorul organic natural, urmărindu-se creșterea numărului de microorganisme din grupele ecofiziologice studiate.

Pe baza rezultatelor acumulate, în desfășurarea activităților de cercetare, din modelul experimental de valorificare a componentelor bioactive din deșeurii de semințe de struguri, se va întocmi documentația tehnică a bioprodusului natural biologic activ și documentația de brevetare a acestui produs. De asemenea, se vor publica rezultatele parțiale în reviste ISI sau în reviste de specialitate recunoscute CNCSIS și indexate în baze de date internaționale.

### Activitatea 1.2. Selectarea semintelor de struguri din tescovina și efectuarea tratamentelor de condiționare și depozitare.

Tescovina – este rezidul fermentat sau nefermentat, obținut la presarea strugurilor proaspeti. Pentru a putea fi utilizată ca sursă pentru selectarea semințelor tescovina a fost supusă unui proces de uscare, în strat subțire la temperatura ambiantă. Din 24 în 24 de ore, masa de tescovina a fost aerată prin paletare pentru a se ușura evaporarea apei și a se evita dezvoltarea în stratul umed de semințe a bacteriilor și a fungilor. După uscare, selectarea semințelor din tescovina s-a efectuat manual în mai multe etape conform operațiunilor prezentate în schema 1 a modelului experimental. În prima etapă s-au separat semințele de pielițe. La acest stadiu pe lângă semințe în proba obținută sunt prezente și fragmente mici de pielițe, astfel în continuare s-a procedat la utilizarea unor site cu ochiuri de dimensiuni mai mici care permit trecerea materialelor vegetale de balast și reținerea doar a semințelor. Semințele selectate au fost etalate, în strat subțire, pe suprafețe curate, în camere bine aerisite pentru uscare. Pe parcursul procesului de uscare și la final s-a determinat umiditatea semințelor prin metoda gravimetrică la temperatura de 130°C timp de o oră.

Operațiunea de condiționare s-a efectuat cu ajutorul unui agregat dotat cu site vibratoare, cu perforații de diferite dimensiuni, pentru selectare doar a semințelor de struguri. Acest agregat este dotat cu un sistem de ventilare care îndepărtează și particole fine de balast. La umiditatea de 8-10% lotul de semințe a fost depozitat în cameră ventilată la o temperatură de aproximativ 10 °C.

### Activitatea 1.3. Obținerea, condiționarea și caracterizarea fizico – chimică a uleiului din semințe de struguri

Extracția uleiului din semințele de struguri este dificilă datorită durtății materialului vegetal, fiind necesare pentru extracție prese performante. Prin presarea la rece randamentul de extracție a fost mic. Extracția cu solvent s-a efectuat cu hexan în vederea obținerii șrotului de semințe delipidat necesar în activitatea de extracție a compușilor polifenolici. S-a utilizat acest solvent, deoarece, atât în țările Uniunii Europene, cât și în țara noastră, spre exemplu Carei, se practică tehnologia de extracție cu hexan pentru obținerea uleiurilor comestibile din floarea soarelui cât și a celor din alte surse vegetale cu utilizare în industria farmaceutică.

Randamentul final de extracție a fost de 8%. Uleiul obținut a fost supus operațiunilor de condiționare și anume decantare, filtrare și repartizare în recipiente de sticlă colorată. Uleiul din semințe de struguri obținut prin procedeul de presare la rece a fost caracterizat organoleptic (tabelul 1) și fizico-chimic (tabelul 2) determinându-se: indicele de refracție, indicele de iod, indicele de aciditate și indicele de peroxizi.

**Tabelul 1**

#### Caracteristicile organoleptice ale uleiului obținut din semințele de struguri

Parametru	Descriere
Aspect	Limpede la 15 °C
Miros	Fără miros
Gust	Gust plăcut
Consistență	Vâscoasă
Culoare	Galben cu tentă brun verzui

**Tabelul 2**

#### Caracteristicile fizico- chimice ale uleiului obținut din semințele de struguri

Parametru	Ulei din semințe struguri	Limite maxime conform literaturii de specialitate
Indicele de refracție	1,473	1,467 -1,485
Indicele de iod, %	68	60 - 90
Indicele de aciditate mg KOH/g	2,04	0,6 – 4,0
Indicele de peroxizi, mmol/kg	4,31	10

Datele obținute arată că din punct de vedere organoleptic și al caracteristicilor fizico chimice, uleiul din semințe de struguri analizat se încadrează în categoria uleiurilor alimentare vegetale. Rezultatele din acest studiu arată că semințele de struguri considerate ca un subprodus obținut din tescovina pot constitui o sursă alternativă pentru obținerea uleiului comestibil.

#### Activitatea I.4. Obținerea extractelor polifenolice brute

Extracția compușilor polifenolici din materialele vegetale este influențată din caracteristicile chimice structurale, metoda de extracție utilizată, dimensiunea particolelor materialului vegetal, precum și de prezența substanțelor interferente. Extractele vegetale sunt amestecuri extrem de complexe din punct de vedere structural. Acest aspect reiese din faptul că natura chimică a polifenolilor vegetali variază de la substanțe simple până la structuri cu grad înalt de polimerizare și că aceste substanțe formează complexe cu carbohidrați, proteine sau alți compuși polifenolici ce prezintă probleme de solubilitate (Maria Teresa Escribano – Bailon ș.a., 2003). Solubilitatea compușilor polifenolici depinde în primul rând de solventul utilizat, gradul de polimerizare al compușilor, precum și de interacțiunile cu alți compuși vegetali.

Toate aceste aspecte conduc la concluzia că în prezent nu este disponibilă o procedură optimă care să asigure extracția totală sau fracționată a compușilor polifenolici. Obiectivul major în realizarea proceselor extractive ale compușilor polifenolici din materialele vegetale îl constituie solubilizarea acestora din structurile celulare fie prin scindarea pereților celulari fie prin difuziunea acestora.

Semințele uscate au fost supuse unui proces de mărunțire cu ajutorul unei mori cu bile iar după sitare, materialul vegetal obținut reprezintă o masă de particule cu dimensiuni de 1-2 mm de culoare brun – roșcat. Materialul vegetal mărunțit a fost ulterior condiționat prin conservarea la rece (4°C) în recipiente etanșe. Pentru îndepărtarea substanțelor cu caracter lipofil (uleiuri volatile, ceruri, acizi și alcooli superiori) prezente în materialul vegetal, acesta a fost în prealabil degresat cu eter etilic în raport de 1 g material vegetal la 20 mL solvent într-un aparat Soxhlet. În urma degresării materialului vegetal s-au obținut extracte lipofile eterice. O altă metoda de delipidare, aplicată de partenerul 1, a fost cea statică, constând în menținerea în contact timp de o oră a materialului vegetal (318 g semințe măcinate) cu 350 mL eter etilic. Delipidarea s-a realizat de patru ori în aceleași condiții. De fiecare dată suspensia a fost filtrată în vederea eliminării uleiului extras.

Pentru obținerea extractelor polifenolice din semințele de struguri selectate din tescovină s-au utilizat mai multe metode de extracție:

- ✓ metoda extractivă continuă Soxhlet
- ✓ extracție cu fluide supercritice (CO<sub>2</sub> lichid) folosind ca modificator organic alcool etilic de concentrație 98%
- ✓ extracție la presiune scăzută (3 bari) cu apă și alcool etilic de concentrație 75%
- ✓ extracție la presiune ridicată (15 bari) cu apă și alcool etilic de concentrație 75%

1. În cazul metodei extractive continuă Soxhlet, variabilele procesului au fost reprezentate de raportul produs vegetal/solvent (1 g material vegetal/10 g solvent); natura solventului utilizat – pentru extracția compușilor polifenolici a fost selectat alcoolul etilic de 94 – 96%; durata procesului extractiv a fost variabilă, determinată de timpul necesar epuizării materialului vegetal (48 – 72 ore); temperatura la care a fost realizat procesul extractiv a fost constantă de 78°C.

2. La extracția cu fluide supercritice (CO<sub>2</sub> lichid) folosind ca modificator organic alcool etilic de concentrație 98%, s-au realizat cinci extracții a câte șapte g de material vegetal utilizând un debit de CO<sub>2</sub> lichid de 1 mL/min. și de alcool etilic de 0,5 mL/min. Durata de extracție a fost de 32 de minute pentru un volum total de lichid de extracție de 48 mL.

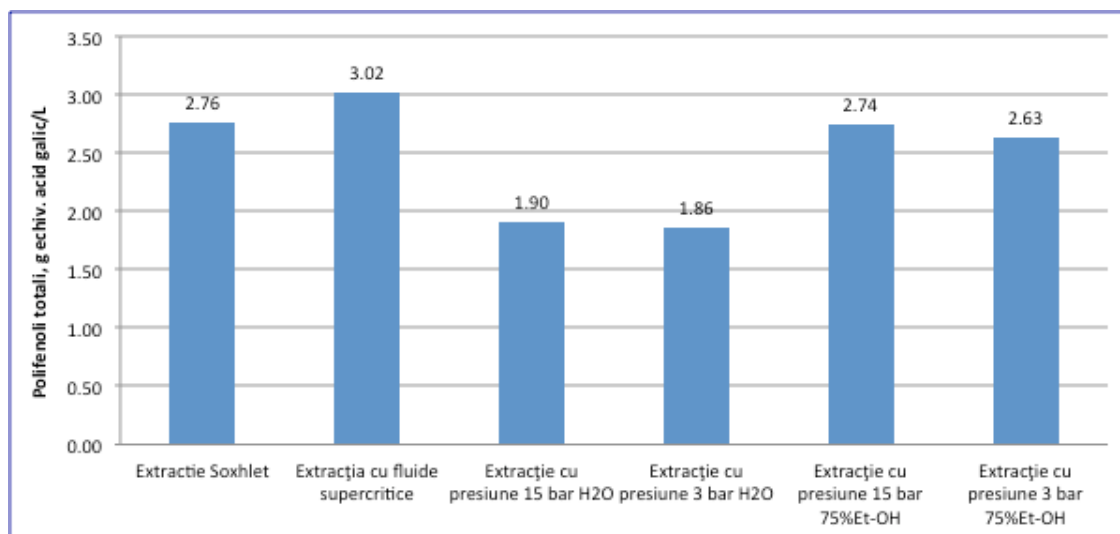
3. În cazul utilizării unei presiuni scăzute de extracție (3 bari), s-au utilizat doi solvenți: apă și alcool etilic de concentrație 75%. Pentru fiecare tip de solvent, apă și alcool etilic, s-a folosit o cantitate de 7,5 g material vegetal (semințe măcinate). Timpul de extracție a fost de 2 minute, colectându-se un volum de 215 mL extract.

4. Extracția la presiune ridicată (15 bari) s-a realizat asemănător cu extracția la presiune joasă (3 bari), utilizându-se ca solvenți apă și alcool etilic de concentrație 75% și o cantitate de 7,5 g material vegetal. Timpul de extracție a fost de 2 minute, colectându-se un volum de 215 mL extract.

În vederea evaluării proprietăților benefice ale extractelor polifenolice obținute din semințele de struguri în menținerea echilibrului metabolic și a stării de sănătate a organismului uman, acestea au fost supuse unui proces de caracterizare preliminară. Astfel, pentru caracterizare preliminară a extractelor polifenolice brute s-au determinat polifenolii totali și indicii de materii tanoide (I.M.T).

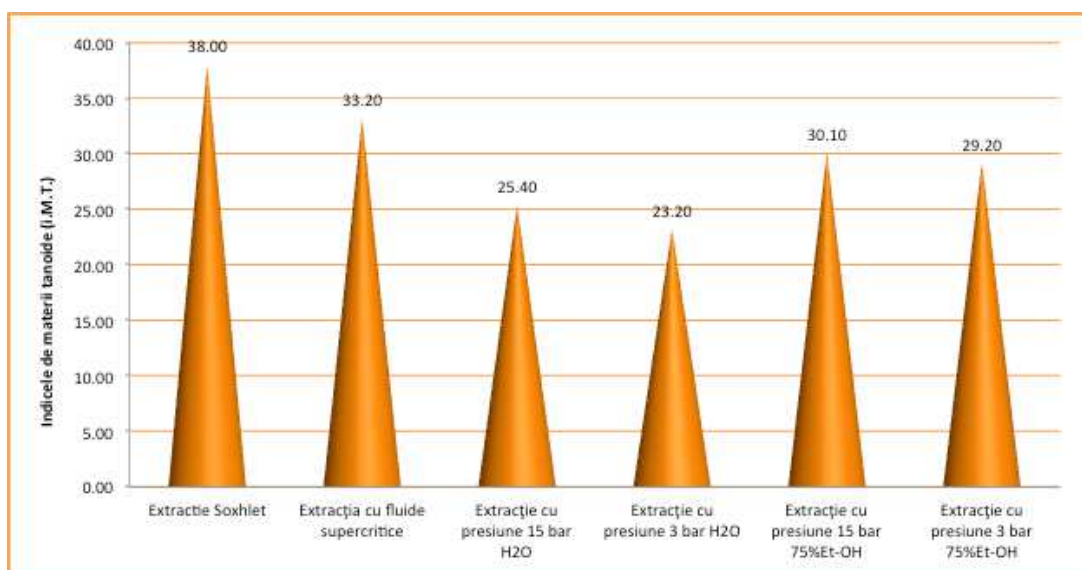
Din exprimarea grafică a rezultatelor privind conținutul în polifenoli totali s-a remarcat extractul vegetal din semințele de struguri obținut prin extracția cu fluide supercritice, cu o concentrație în polifenoli totali de 3,02 g GAE/L (figura 1).





**Fig. 1 - Conținutul de polifenoli totali a extractelor obținute din semințele de struguri**

În ceea ce privește indicele de materii tanoide, valorile cele mai mari au fost determinate la extractul obținut prin metoda Soxhlet - 38,0 și extractul obținut cu fluide supercritice - 33,2 (figura 2). Extractele obținute la presiune ridicată și scăzută, care au folosit ca solvent apa, au prezentat cele mai mici valori atât pentru indicele de materii tanoide (25,4 și 23,2) cât și pentru concentrația în polifenoli totali (1,86 și 1,90 g GAE/L).

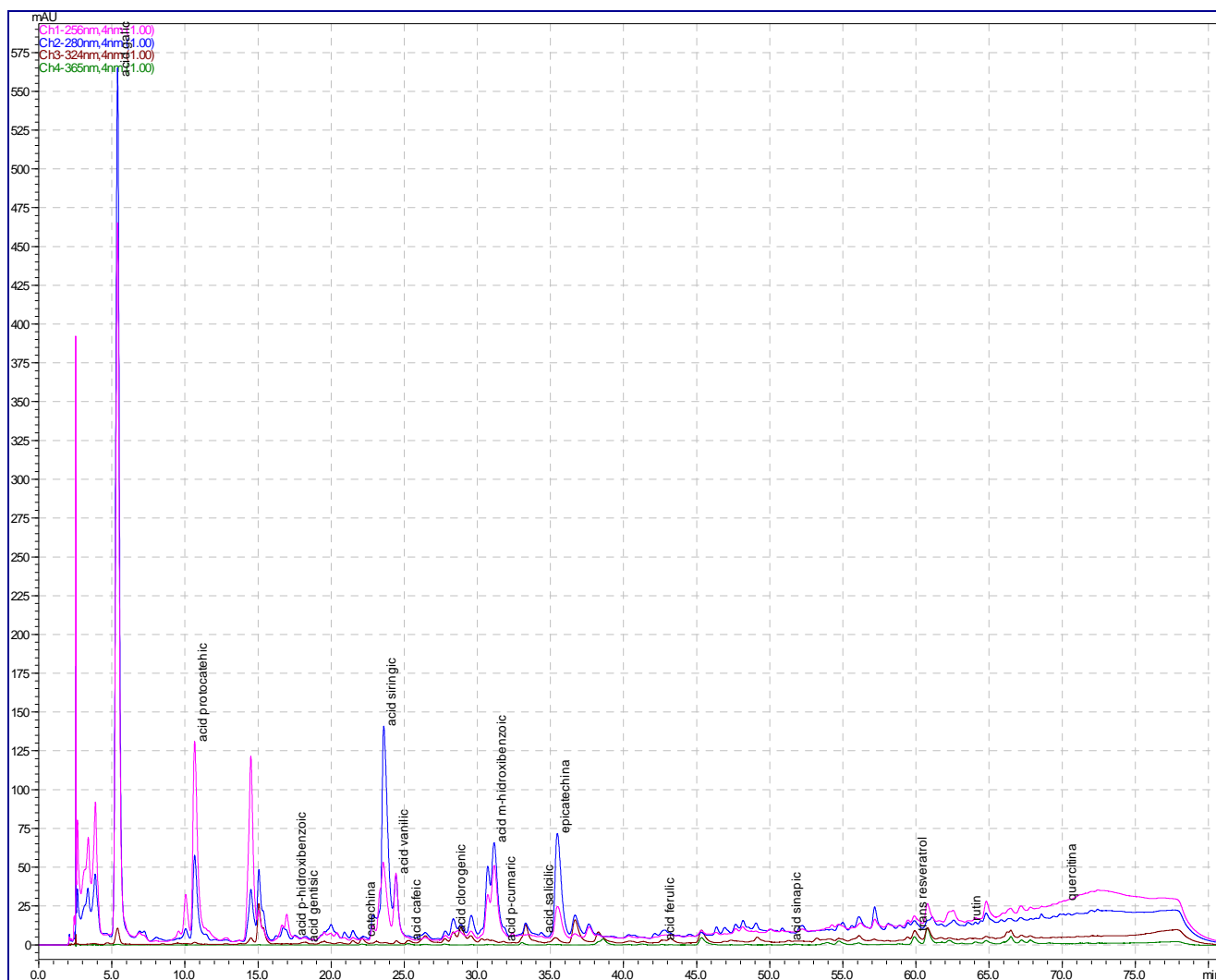


**Fig. 2 - Indicele de materii tanoide a extractelor polifenolice obținute prin diferite metode de extracție**

#### **Activitatea I.5. Concentrarea în vid a extractelor brute polifenolice și caracterizarea fizico-chimică**

Concentrarea s-a efectuat la un rotaevaporator ce permite controlul temperaturii și a presiunii. În funcție de natura solventului, apă sau alcool etilic, concentrarea s-a realizat diferit. Astfel, pentru probele extrase cu alcool, concentrarea s-a efectuat la o presiune de 120 mbar, temperatura de 40°C și o viteză de rotație de 32 rpm, iar pentru probele extrase cu apă condițiile de concentrare au fost: presiune de 40 mbar, temperatura de 40°C și o viteză de rotație de 80 rpm.

Pentru caracterizarea extractelor polifenolice concentrate obținute s-a realizat analiza HPLC (cromatografie de lichide de înaltă performanță) prin care au fost identificați și cuantificați o serie de acizi fenolici, stilbeni (trans-resveratrolul) unele taninuri nehidrolizabile (catechina și epicatechina). Metoda utilizată pentru determinarea acizilor fenolici, a stilbenilor și a unor taninuri nehidrolizabile a fost cea prezentată de M. Castellari (Castellari ș.a., 2002). Identificarea acestora s-a realizat pe baza cromatogramelor (figura 3).



**Fig 3 - Cromatograma extractului polifenolic obținut prin extracție cu fluide supercritice**

Din analiza datelor prezentate în tabelul 3 se remarcă în mod deosebit extractul obținut prin extracție cu fluide supercritice, acesta prezentând cel mai mare conținut de acid galic, acid protocatehic, acid siringic, acid vanilic și acid *m*-hidroxibenzoic.

**Tabelul 3**

**Acizi hidroxi benzoici (mg/L) identificați în extractele polifenolice obținute**

Metoda de extracție	acid galic	acid protocatehic	acid <i>p</i> -hidroxibenzoic	acid gentisic	acid siringic	acid vanilic	acid <i>m</i> -hidroxibenzoic	acid salilic
Extracție Soxhlet	10,08	-	0,95	-	114,05	0,45	0,40	92,86
Extracția cu fluide supercritice	317,42	366,87	2,79	0,31	126,51	34,77	29,86	2,26
Extracție cu presiune 15 bari H <sub>2</sub> O	40,12	35,81	1,40	0,91	1,53	5,51	5,32	0,53
Extracție cu presiune 3 bari H <sub>2</sub> O	20,16	11,00	0,96	0,14	6,31	1,07	0,06	-
Extracție cu presiune 15 bari 75%Et-OH	54,73	41,78	1,18	2,27	13,92	3,83	2,50	6,17
Extracție cu presiune 3 bari 75%Et-OH	67,07	51,56	1,79	0,68	0,30	4,61	0,25	4,83

\* sub limita de detecție

Cel mai important acid hidroxibenzoic, acidul galic a prezentat valori cuprinse între 10,08 mg/L la extractul obținut prin metoda de extracție Soxhlet și 317,42 mg/L la extractul obținute prin extracție cu fluide supercritice. În ceea ce privește acidul salicilic, deși în literatura de specialitate este precizat faptul că acesta se formează pe parcursul procesului de fermentație alcoolică, acesta a fost identificat în cantitate mare în extractul obținut prin metoda de extracție Soxhlet, respectiv 96,64 mg/L. Acidul salicilic a fost identificat și în extractele obținute prin celelalte metode de extracție, dar în cantități mult mai mici, între 0,53 și 6,17 mg/L. De asemenea, a fost identificat acidul siringic, cu limite de variație foarte mari între 0,30 mg/L (extractul obținut la presiune scăzută cu alcool etilic 75%) și 126,51 mg/L (la extractul obținute prin extracție cu fluide supercritice). În extractele polifenolice analizate au fost identificați și alți acizi hidroxibenzoici, cum ar fi: acidul protocatehic, acidul p-hidroxibenzoic, acidul gentisic, acidul m-hidroxibenzoic și acidul vanilic.

Prin analiza HPLC a extractelor polifenolice concentrate au fost identificați și o serie de acizi hidroxicinamici, respective acidul cafeic, clorogenic, p-cumaric, ferulic și sinapic (tabelul 4). Se remarcă faptul că în cazul extractelor obținute la presiune scăzută cu apă, cantitatea de acizi hidroxicinamici a fost sub limita de detecție.

**Tabelul 4**

**Acizi hidroxicinamici (mg/L) identificați în extractele polifenolice obținute**

Metoda de extracție	acid cafeic	acid clorogenic	acid p-cumaric	acid ferulic	acid sinapic
Extracție Soxhlet	0,53	2.287	4,58	0,98	0,36
Extracția cu fluide supercritice	1,27	15,06	0,25	0,38	0,20
Extracție cu presiune 15 bari H <sub>2</sub> O	1,54	2,62	0,31	0,33	-
Extracție cu presiune 3 bari H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-
Extracție cu presiune 15 bari 75%Et-OH	2,32	1,90	0,68	1,94	-
Extracție cu presiune 3 bari 75%Et-OH	0,15	2,78	0,71	3,44	0,21

\* sub limita de detecție

Prin analiza HPLC a extractelor polifenolice s-a evidențiat prezența unor taninuri nehidrolizabile (condensate), respectiv catechina și epicatechina (tabelul 5). În ceea ce privește conținutul de catechină se remarcă intervalul mare de variație, cantități mai mari fiind extrase la metodele la care s-a folosit ca solvent alcoolul etilic. În cazul epicatechinei, cantități net superioare au fost identificate la extractele obținute prin extracția cu fluide supercritice (157,91 mg/L).

**Tabelul 5**

**Taninuri nehidrolizabile (condensate) identificate în extractele polifenolice obținute**

Metoda de extracție	catechină, mg/L	epicatechină, mg/L
Extracție Soxhlet	6,05	4,58
Extracția cu fluide supercritice	4,18	157,91
Extracție cu presiune 15 bari H <sub>2</sub> O	2,33	0,14
Extracție cu presiune 3 bari H <sub>2</sub> O	0,97	-
Extracție cu presiune 15 bari 75%Et-OH	3,76	1,64
Extracție cu presiune 3 bari 75%Et-OH	0,40	3,97

Pe lângă acizii fenolici în extractele obținute din semințe a fost identificat și trans-resveratrolul. Acesta funcționează ca agent antiinflamator, conferind capacitate extractelor de a reduce trigliceridele și valoarea colesterolului din sânge (tabelul 6).

**Tabelul 6**

**Conținutul în stilbeni și flavone a extractele polifenolice obținute**

Metoda de extracție	trans-resveratrol, mg/L	rutina, mg/L	quercitina, mg/L
Extracție Soxhlet	2,40	0,55	1,54
Extracția cu fluide supercritice	1,38	0,75	0,37
Extracție cu presiune 15 bari H <sub>2</sub> O	-	0,72	-
Extracție cu presiune 3 bari H <sub>2</sub> O	-	-	-
Extracție cu presiune 15 bari 75%Et-OH	0,02	0,29	0,11
Extracție cu presiune 3 bari 75%Et-OH	0,21	20,60	1,15

Ca și în cazul acizilor fenolici, cantitatea cea mai mare a fost identificată la extractele obținute prin metoda Soxhlet și extracția cu fluide supercritice, respective 2,40 și 1,38 mg/L. Dintre flavone, prin analiza HPLC au fost identificate rutina și quercitina. Se remarcă îndeosebi extractul obținut prin extracția Soxhlet cu 1,54 mg/L quercitină și extractul obținut la presiune scăzută cu apă cu 20,6 mg/L rutina.

Caracterizarea extractelor polifenolice realizată prin analiza HPLC (cromatografie de lichide de înaltă performanță) permite recomandarea metodelor de extracție cu fluide supercritice și metoda Soxhlet. De asemenea, se constată o extracție superioară a acizilor fenolici, a taninurilor nehidrolizabile, a stilbenilor și a flavonelor în cazul extractelor la care s-a utilizat ca solvent alcoolul etilic.

**Activitatea I 6. Stabilirea raportului optim material vegetal/volum solvent și a timpului optim de extracție a compușilor fenolici.**

Conform planului de cercetare prezentăm rezultatele parțiale obținute în cadrul activității 1.6 la nivel de laborator privind stabilirea raportului optim material vegetal, șrot semințe de struguri delipidat/volum solvent și timpul optim de extracție a compușilor fenolici. În cadrul acestei activități s-au stabilit diferite rapoarte solid/solvent și anume grame deșeu de semințe de struguri delipidat/volum de alcool etilic 96 °C. În acest experiment s-a urmărit dinamica procesului de extracție a compușilor fenolici în două etape extractive prin monitorizarea densității optice DO la 280 nm, constatându-se o creștere progresivă în procesele extractive a compușilor polifenolici totali. Valoarea maximă a densității optice s-a înregistrat după opt ore, în cele două extracții, la raportul S/L- 1/4. În cazul rapoartelor 1/5 – 1/8 valoarea maximă a densității optice s-a înregistrat după 10 ore în ambele etape de extracție. După 8 – 10 ore de extracții, valorile DO cresc nesemnificativ având tendințe de scădere la 12 ore.

Din datele prezentate în tabelul 7 s-a constatat că valoarea cea mai mare în compuși polifenolici totali s-a realizat după 10 ore în prima etapă de extracție la raportul s/L 1/8, respectiv 2,4 g /100 g șrot delipidat. În cazul extractelor rapoartelor 1/4, 1/5, 1/6 și 1/7 s-au obținut valori apropiate ale concentrațiilor polifenolilor totali, dar mai mici față de extractul obținut la raportul 1/8.

**Tabelul 7**

**Dinamica concentrației compușilor fenolici totali, g GAE/100 g șrot delipidat.**

Timp (ore) Raport	1/4		1/5		1/6		1/7		1/8	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
2	1,80	0,40	1,89	0,49	1,78	0,53	2,06	0,39	1,71	0,34
4	2,09	0,47	2,15	0,52	1,94	0,60	2,25	0,47	2,23	0,40
6	2,19	0,54	2,18	0,53	2,04	0,61	2,30	0,47	2,29	0,42
8	<b>2,26</b>	<b>0,58</b>	2,22	0,56	2,15	0,62	2,31	0,48	2,35	0,45
10	2,20	0,59	2,26	0,57	2,18	0,63	2,34	0,49	2,40	0,48
x12	2,19	0,56	2,26	0,56	2,17	0,62	2,33	0,48	2,34	0,47

În etapa a doua de extracție , datele relevă valori ale concentrației polifenolilor totali apropiate după 10 ore de extracție în cazul rapoartelor 1/5, 1/8, valoare atinsă însă și în cazul raportului 1/4 după opt ore de extracție.

Conform datelor consemnate în tabelul 8 s-au obținut cinci extracte polifenolice brute cu variații nesemnificative în ceea ce privește concentrația de polifenoli totali. Valorile determinate au fost cuprinse între 2,81 – 2,88 g GAE/100 g șrot delipidat și anume la opt ore s-au extras 2,84 g GAE/100 g în cazul raportului 1/4 și concentrații cuprinse între 2,81 – 2,88 g/ GAE/100 g în cazul rapoartelor 1/5 – 1/8 după 10 ore de extracție.

**Tabelul 8**

**Compuși polifenolici totali (extractia I+II), g GAE/100 g șrot delipidat**

Timp (ore) Raport	1/4	1/5	1/6	1/7	1/8
2	2,20	2,38	2,31	2,45	2,05
4	2,56	2,67	2,54	2,72	2,63
6	2,72	2,71	2,65	2,77	2,71
8	2,84	2,78	2,77	2,79	2,80
10	2,79	2,83	2,81	2,83	2,88
12	2,75	2,82	2,79	2,81	2,81

### **Activitatea I.7 Determinarea condițiilor de fracționare ținând cont de cantitatea de proantocianidine/cantitatea de agenți de fracționare, timpii de contact, stabilirea temperaturii optime pentru realizarea fracționării**

Taninurile condensate din deșeurile de semințe de struguri numite și proantocianidine reprezintă o grupă de substanțe naturale, cu structură polifenolică cu un spectru larg de activități biologice. Ele reprezintă o clasă importantă în cadrul metabolismului secundar al plantelor. Proantocianidinele sunt un grup de bioflavonoizi naturali ce se află sub formă de oligomeri sau polimeri ai unităților polihidroxi flavan-3-ol, cum ar fi (+)-catechină și (-)-epicatechină.

În prezent, extractele ale acestor compuși din semințe de struguri sunt utilizate în industria farmaceutică și ca aditiv în industria alimentară. Utilizarea în practică a compușilor polifenolici proantocianidinici sub formă de preparate bioactive, va fi posibilă prin aplicarea metodologiei complexe de lucru în procesele de extracție cu solvenți, propusă în modelul experimental și modificarea structurii acestora în compuși relativ simpli. Proantocianidinele extrase cu solvenți nu sunt solubile în apă, motiv pentru care nu pot fi utilizate practic ca substanțe bioactive, antifungice, antibacteriene. Hidrosolubilitatea bioprodusului constituie condiția principală pentru ca acesta să poată fi utilizat în practica viticolă.

Fracționarea semipreparativă a proantocianidinelor extrase din semințele de struguri se face în mod normal prin cromatografie pe coloană. Procedura de separare se bazează pe cromatografia cu filtrare pe gel-permeație de gel (GPC). Ca fază staționară se folosește Sephadex LH-20. Un exemplu de lucru este prin utilizarea unei coloane umplută cu Sephadex suspendat în etanol 96%. Eluarea coloanei se realizează cu același solvent.

Pentru a separa cu rezultate bune atât (+) - catechina cât și (-) - epicatechina, coloana se poate umple cu o suspensie Sephadex în apă iar eluția se efectuează cu o soluție de acid acetic cu creșterea treptată a concentrației de acid de la 0 la 25%. Monitorizarea eluatului din coloană se face prin detecție UV la 280 nm. Frațiile astfel obținute se analizează prin HPLC și/sau spectrometrie de masă: MALDI-TOF, IT-TOF, DART-MS, HPLC-MS.

O altă metodă de extracție utilizează rășina numită Toyopearl TSK HW-40 (F) gel (Tosoh corp., Tokyo). Monomerii oligomerii se eluează din coloană cu un amestec etanol-apă (55:45, v/v), care conține 0,05% acid trifluoroacetic. Proantocianidinele polimerice se eluează cu un amestec etanol-apă (60:40, v/v). Se mai pot utiliza ca faze solide de separare și: Fractogel TSK HW-40 (s) și pulbere de celuloză Microcrystalline.

Trebuie menționat faptul că metodologiile referitoare la separarea de fenoli non-polari au căpătat o atenție din ce în ce mai mare în literatura de specialitate. Dar cele mai multe dintre metode sunt destul de complicate, consumatoare de timp și necesită o cantitate mare de deșeurile. Pe de altă parte, utilizarea unei metode bazate pe extracție în fază solidă (SPE), permite o separare mai rapidă și eficientă a compușilor fenolici.

Metoda constă în aplicarea soluției de probă pe un cartuș SPE (de exemplu, C18 sep-Pak), urmat de eluare cu solvenți de polaritate diferită. Componentele cu masă moleculară mică sunt separate de oligomerii și polimerii cu masă moleculară mare. De exemplu, se poate realiza fracționarea preliminară pe un cartuș SPE. Aceasta constă în eluarea flavonolilor monomerici cu eter dietilic și a celor oligomerii cu metanol. Se eluează fenoloxiacizii cu un tampon apos (pH 7), apoi fracțiile monomerice și oligomerice de flavan-3-oli au fost eluate cu acetat de etil. Urmează o spălare finală cu metanol pentru a îndepărta proantocianidinele polimerice. Frațiunea care conține monomerii și oligomerii de flavan-3-oli a fost trecută prin cartușul SPE în repetate ori pentru a elua monomerii cu eter dietilic și oligomerii cu metanol.

### **Activitatea I.8. Proprietatea antioxidantă a uleiului natural și a extractului proantocianidinic, produși separați succesiv, din semințele de struguri prin flowcitometria nivelului speciilor reactive de oxigen la nivelul diverselor culturi celulare tratate, comparativ cu cele martor.**

Extractele polifenolice concentrate primite de la partenerul P1 au fost notate astfel: EP1 extract polifenolic obținut cu fluide supercritice, EP2 – extract obținut la presiune ridicată (15 bari) cu apă, EP3 - extract obținut la presiune scăzută (3 bari) cu apă, EP4 - extract obținut la presiune ridicată (15 bari) cu alcool 75% și EP5 - extract obținut la presiune scăzută (3 bari) cu alcool 75%.

Proprietatea antioxidantă *in vitro* a uleiului natural și a extractelor polifenolice obținute din semințele de struguri, în condiții de laborator, a fost evidențiată și cuantificată prin flowcitometria nivelului speciilor reactive de oxigen la nivelul diverselor culturi celulare tratate, comparativ cu cele martor (tabelul 9).

Tabelul 9

**Evidențierea și evaluarea nivelului speciilor reactive ale oxigenului în culturile celulare sanatoase Vero și tumorale HeLa tratate cu extractele polifenolice globale primare și cu uleiul de struguri**

Lot/ Tratament	Culturi de celule Vero				Culturi de celule HeLa			
	SRO -		SRO+		SRO -		SRO+	
	Media ± ES	p<	Media ± ES	p<	Media ± ES	p<	Media ± ES	p<
Martor	99.92±0.05(5)		0.08±0.05		99.95±0.02(5)		0.05±0.02(5)	
Control + (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	83.50±1.14(5)	0.001	16.5±1.1(5)	0.001	82.42±1.50(5)	0.001	17.58±1.50(5)	0.001
EP4 200 µg/mL	99.94±0.02(5)	NS	0.06±0.02(5)	NS	99.96±0.01(5)	NS	0.04±0.01(5)	NS
EP4 300 µg/mL	99.96±0.02(5)	NS	0.04±0.02(5)	NS	100.00±0.00(5)	<0.05	0.00±0.00(5)	<0.05
EP5 200 µg/mL	99.20±0.33(5)	0.05	0.80±0.33(5)	NS	99.98±0.01(5)	NS	0.02±0.01(5)	NS
EP5 300 µg/mL	99.25±0.24(5)	0.05	0.75±0.24(5)	<0.05	100.00±0.00(5)	NS	0.00±0.00(5)	NS
Martor	99.96±0.01(5)	-	0.04±0.01(5)	-	99.96±0.01(5)	-	0.04±0.01(5)	-
Control + (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	83.50±1.14(5)	0.001	16.5±1.1(5)	0.001	82.42±1.50(5)	0.001	17.58±1.50(5)	0.001
Ulei 450 µg/mL	99.56±0.10(5)	<0.001	0.44±0.10	<0.001	99.84±0.11	NS	0.16±0.11	NS
Ulei 600 µg/mL	98.56±0.39(5)	<0.001	1.44±0.39	<0.001	99.70±0.13	<0.05	0.30±0.13	<0.05

Notă: Cifrele din paranteza reprezintă numărul culturilor celulare ale fiecărui lot testat.

Investigarea intensității procesului de generare metabolică a diferitelor specii reactive ale oxigenului (SRO) în condițiile tratamentului de lungă durată cu diferite doze ale extractelor polifenolice brute sau ale uleiului nu a condus la înregistrarea unor modificări semnificative între loturile tratate și lotul martor, în cazul ambelor culturi celulare.

În cazul culturilor celulare de control pozitiv, tratate cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, folosit ca agent extracelular stresor cu impact intracelular oxidant, prezintă o intensificare inerentă a proceselor de generare a speciilor reactive ale oxigenului, evidențiindu-se astfel funcționalitatea sistemelor celulare specifice redox de răspuns în cazul SRO.

Rezultatele obținute sugerează neafectarea de către extractele polifenolice brute a proceselor metabolice responsabile de menținerea echilibrului între generarea și epurarea SRO. Deși diferențe semnificative au fost înregistrate din punct de vedere statistic, din punct de vedere funcțional acestea nu prezintă importanță deoarece diferențele dintre nivelul SRO în cazul probelor tratate și nivelul SRO în cazul martorului sunt minime.

**Activitatea I.9. Proteinosinteza și viabilitatea celulară a culturilor de celule Vero, renale de maimuță, și a celulelor tumorale umane HeLa supuse acțiunii uleiului natural și a extractului proantocianidic**

Impactul diferitelor doze de extracte polifenolice și ulei asupra **proteinosintezei și viabilității celulare** a culturilor de celule Vero și a celulelor tumorale umane HeLa supuse tratamentului *in vitro* este constatat din analiza rezultatelor experimentale centralizate în tabele 10 și 11.

Investigarea procesului de proteinosinteză celulară în culturile de celule normale Vero și neoplazice HeLa cu diferitele doze ale extractelor polifenolice și ale uleiului, prin metoda cu albastru de metilen, a relevat un efect diferențiat al bioproduselor testate dependent de tipul de cultură celulară.

Impactul perturbator al bioprodusilor testați este mai atenuat în cazul culturilor de celule normale Vero comparativ cu cel al celulelor neoplazice HeLa, caz în care întâlnim o perturbare semnificativă a procesului de proteinosinteză celulară în cazul extractelor polifenolice EP4 și EP5 la dozele de 200 și 300 µg/mL. Uleiul obținut din semințele de struguri nu interfează semnificativ cu biogeneza proteică, indiferent de doză, atestând lipsa unui impact citotoxic.

Tabelul 10

**Interactiunea diferitelor doze ale extractelor polifenolice și ale uleiului cu procesul de proteinosinteza celulara**

Lot/ Tratament	Culturi de celule Vero			Culturi de celule HeLa		
	Media ± ES	p<	% Variatie	Media ± ES	p<	% Variatie
Martor	100.0±0.0(5)	-	-	100.0±0.0	-	-
EP1 25 µg/mL	103.0±3.9(5)	NS	+3.0	100.6±3.6	NS	+0.6
EP1 50 µg/mL	97.4±6.3(5)	NS	- 2.6	92.6±4.0(5)	NS	-7.4
EP1 100 µg/mL	91.4±5.6(5)	NS	-8.6	87.2±4.3(5)	0.05	-12.8
EP1 200 µg/mL	88.3±4.6(5)	0.05	-11.7	80.0±5.8(5)	0.02	- 20.0
EP1 300 µg/mL	85.2±4.3(5)	0.01	-15.8	73.2±5.8(5)	0.002	-26.8
EP2 25 µg/mL	101.9±1.1(5)	NS	+1.9	92.3±3.9(5)	NS	-7.7
EP2 50 µg/mL	94.7±7.7(5)	NS	-5.3	87.8±5.1(5)	0.05	-12.2
EP2 100 µg/mL	90.4±5.1(5)	NS	- 9.6	79.9±4.2(5)	0.002	-20.1
EP2 200 µg/mL	85.2±5.0(5)	0.05	-14.8	74.6±5.2(5)	0.002	-25.4
EP2 300 µg/mL	82.4±4.9(5)	0.01	-17.6	70.0±4.4(5)	0.001	-30.0
EP3 25 µg/mL	100.4±4.71	NS	+0.4	100.7±4.2(5)	NS	+0.7
EP3 50 µg/mL	97.7±2.7(5)	NS	-2.3	91.4±3.4(5)	0.05	-8.6
EP3 100 µg/mL	91.6±4.1(5)	NS	-8.4	85.4±3.6(5)	0.01	-14.6
EP3 200 µg/mL	85.9±5.5(5)	<0.05	-14.1	78.9±2.9(5)	0.001	-21.1
EP3 300 µg/mL	84.7±3.8(5)	<0.01	-15.3	68.3±2.7(5)	0.001	-31.7
EP4 25 µg/mL	100.0±0.0(5)	0	0	95.1±5.9(5)	NS	-4.9
EP4 50 µg/mL	91.1±4.6(5)	NS	-8.9	68.8±3.7(5)	<0.001	-31.2
EP4 100 µg/mL	84.4±5.6(5)	0.05	-15.6	38.6±4.6(5)	<0.001	-61.4
EP4 200 µg/mL	77.9±4.7(5)	0.01	-22.0	36.0±2.7(5)	<0.001	-64.0
EP4 300 µg/mL	54.7±2.7(5)	0.001	-35.3	15.9±4.5(5)	<0.001	-84.1
EP5 25 µg/mL	101.6±4.9(5)	NS	+1.6	102.2±6.5(5)	NS	+2.2
EP5 50 µg/mL	99.2±3.5(5)	NS	-0.8	90.5±5.5(5)	NS	-9.5
EP5 100 µg/mL	97.2±2.7(5)	NS	-2.8	88.48±5.7(5)	NS	-11.5
EP5 200 µg/mL	89.3±3.3(5)	0.01	-10.7	31.4±2.8(5)	<0.001	-68.6
EP5 300 µg/mL	76.2±3.9(5)	0.001	-23.8	30.4±2.3(5)	<0.001	-69.6
Ulei 150 µg/mL	95.0± 1.0 (5)	NS	- 5.0	84.0±3.0 (5)	NS	-16.0
Ulei 300 µg/mL	89.5± 2.2 (5)	0.001	-10.5	74.7±3.7 (5)	NS	-25.3
Ulei 450 µg/mL	84.5±3.0(5)	0.001	- 15.5	74.0±3.8(5)	0.001	-26.0
Ulei 600 µg/mL	79.3 ±5.6 (5)	0.001	- 20.7	72.9±3.3 (5)	0.001	-27.1

Cifrele din paranteza reprezinta numarul culturilor celulare ale fiecarui lot testat.

Tabelul 11

**Gradul de viabilitate celulara (%) - exprimata de raportul celule vii / moarte al culturilor de celule sanatoase Vero si respectiv de celule tumorale HeLa, tratate 48 ore cu diferite doze ale extractelor polifenolice și ale uleiului**

Lot/ Tratament	Culturi de celule Vero			Culturi de celule HeLa		
	Media ± ES	p<	% variatie	Media ± ES	p<	%Variatie
Martor	100.0±0.0 (5)	-		100.0±0.0 (5)	-	-
EP1 5 µg/mL	103.3±1.9 (5)	NS	3.28	103.6±6.7 (5)	NS	+3.6
EP1 15 µg/mL	99.9±2.9 (5)	NS	-0.1	82.9±9.3 (5)	NS	-17.1
EP1 30 µg/mL	92.3±2.2 (5)	0.01	-7.7	78.5±8.2 (5)	0.05	-21.5
EP1 45 µg/mL	87.8±2.4 (5)	0.001	-12.2	77.1±6.0 (5)	0.01	-22.9
EP2 5 µg/mL	96.1±1.6 (5)	0.05	-3.9	89.2±4.4 (5)	0.05	-10.8
EP2 15 µg/mL	94.6±3.6 (5)	NS	-5.4	75.0±4.6 (5)	0.001	-25.0
EP2 30 µg/mL	91.1±3.9 (5)	0.05	-8.9	73.8±2.9 (5)	0.001	-26.2
EP2 45 µg/mL	83.3±6.7 (5)	0.05	-16.7	71.3±7.0 (5)	0.01	-28.7
EP3 5 µg/mL	99.7±2.8 (5)	NS	-0.3	94.5±5.4 (5)	NS	-5.6
EP3 15 µg/mL	95.5±3.0 (5)	NS	-4.5	86.7±3.4 (5)	0.01	-13.3
EP3 30 µg/mL	91.7±6.5(5)	NS	-8.3	82.0±1.6 (5)	0.001	-18.0
EP3 45 µg/mL	89.2±5.6 (5)	NS	-10.8	79.5±4.5 (5)	0.01	-20.5
EP4 5 µg/mL	96.4±2.3 (5)	NS	-3.6	82.2±1.9 (5)	0.001	-17.8
EP4 15 µg/mL	92.6±6.4 (5)	NS	-7.4	77.4±5.1 (5)	0.01	-22.6
EP4 30 µg/mL	90.3±1.7 (5)	NS	- 9.7	76.1±1.7 (5)	0.001	-23.9
EP4 45 µg/mL	86.6±10.2 (5)	NS	-13.4	73.6±1.0 (5)	0.001	-26.4
EP5 5 µg/mL	93.5±4.8	NS	-6.5	83.1±2.5 (5)	0.001	-16.9
EP5 15 µg/mL	91.0±2.9	0.01	-9.0	78.6±4.8 (5)	0.01	-21.4
EP5 30 µg/mL	84.3±5.0	0.01	-15.6	75.4±2.6 (5)	0.001	-24.6
EP5 45 µg/mL	75.9±6.0	0.01	-24.0	70.7±1.0 (5)	0.001	-29.3
EP1 50 µg/mL	100.3±3.2 (5)	NS	0	97.00±5.2(5)	NS	- 3.0
EP1 100 µg/mL	97.5±3.9 (5)	NS	-2.5	95.1±6.1(5)	NS	- 4.9
EP1 200 µg/mL	95.1±1.9 (5)	0.05	-4.9	92.8±5.1(5)	NS	-7.2
EP1 300 µg/mL	88.0±3.9(5)	0.05	- 12.0	84.6±11.7 (5)	NS	-15.4
EP2 50 µg/mL	100. 5±6.1(5)	NS	+ 0.5	100.4±3.4(5)	<0.01	+0.4
EP2 100 µg/mL	100.2±5.4(5)	NS	+0.2	94.18±5.5(5)	NS	-5.8
EP2 200 µg/mL	98.3±5.2(5)	NS	-1.7	93.82±5.6(5)	NS	6.2
EP2 300 µg/mL	95.2±3.0(5)	NS	- 4.8	91.90±4.0(5)	NS	-8.1
EP3 50 µg/mL	100.5±9.3(5)	NS	+0.5	93.8±2.8(5)	<0.05	-6.15
EP3 100 µg/mL	101.8±3.7(5)	NS	+1.8	83.85±3.9(5)	<0.01	-16.15
EP3 200 µg/mL	103.7±5.7(5)	NS	+3.7	79.44±2.3(5)	<0.001	-20.56
EP3 300 µg/mL	105.4±7.4(5)	NS	+5.4	74.55±2.6(5)	<0.001	-25.45
EP4 50 µg/mL	91.9±15.5(5)	NS	-8.1	100.0±5.2(5)	NS	0
EP4 100 µg/mL	84.5±4.65(5)	<0.01	-15.5	89.0±8.1(5)	NS	-11.0.
EP4 200 µg/mL	73.2±9.5(5)	<0.05	-26.8	46.0±4.2(5)	0.001	-54.0
EP4 300 µg/mL	64.5±2.1(5)	<0.001	-35.5	32.6±2.1(5)	0.001	-67.4
EP5 50 µg/mL	86.10±4.1(5)	<0.01	-13.9	98.8±2.4(5)	NS	-1.2
EP5 100 µg/mL	79.2 ±4.3(5)	<0.001	-20.8	96.0±6.1(5)	NS	-3.9
EP5 200 µg/mL	77.8±1.1(5)	<0.001	-22.2	71.8±4.2(5)	<0.001	-28.2
EP5 300 µg/mL	75.6±3.3(5)	<0.001	-24.4	51.3±4.6(5)	<0.001	-48.7
Ulei 150 µg/mL	98.1±1.6 (5)	NS	-1.9	100.7±0.8 (5)	NS	0
Ulei 300 µg/mL	95.4±1.2 (5)		-4.6	97.4±1.8 (5)	NS	-7.7%
Ulei 450 µg/mL	94.0±2.1 (5)	0.05	- 6.1	94.1±3.3 (5)	NS	- 5.9%
Ulei 600 µg/mL	93.2±2.8 (5)	0.05	- 6.8	89.1±4.4 (5)	0.05	-10.9%



Evaluarea impactului bioextractelor brute, primare, de natură polifenolică și a uleiului, obținute din semințele de struguri asupra viabilității celulare determinate prin metoda cu MTT a relevat un efect diferențiat asupra celor două tipuri de culturi celulare (normale și neoplazice). În cazul culturilor de celule normale Vero gradul de afectare a viabilității celulare este nesemnificativ spre moderat, atât în cazul extractelor polifenolice cât și a uleiului. Un important impact citotoxic (50% - 67% ) se înregistrează în culturile de celule neoplazice HeLa în cazul compusilor polifenolici primari EP4 și EP5 în doze de 200 și 300 μg/mL, în timp ce uleiul, indiferent de doza utilizată, determină un efect minor, neglijabil de perturbare a viabilității celulare.

**Activitatea I.10. Comportamentul procesului de apoptoză celulară al culturilor celulare Vero și HeLa supuse acțiunii bioprodusului biologic activ obținut în condiții de laborator**

O ultima direcție de cercetare asumată în acest prim demers se refera la analiza comportamentului procesului de apoptoză celulară a culturilor celulare Vero și HeLa supuse acțiunii bioproduselor biologice active obținute în condiții de laborator.

Investigarea procesului de apoptoză celulară la nivelul culturilor de celule normale Vero și neoplazice HeLa supuse tratamentului cu extractele polifenolice și cu ulei din semințe de struguri comparativ cu comportarea acestui proces celular în cazul celulelor martor, o modulare a intensității procesului de apoptoză, aceasta fiind dependentă de tipul de culturi celulare și de doza de tratament, rezultatele înregistrate fiind prezentate în tabelele 12.1 și 12.2 și ilustrate grafic în citogramele 4 și 5. Astfel, în cazul culturilor de celule normale Vero, remarcăm o prezență relativ scăzută a celulelor apoptotice și a celor preapoptotice, pe fondul unui număr mare de celule vii și a unui număr crescut de celule moarte, în cazul extractelor polifenolice EP4 și EP5 la dozele de tratament utilizate, în timp ce în cazul culturilor de celule neoplazice HeLa înregistrăm o intensificare a procesului de apoptoză - cea mai evidentă creștere fiind în cazul extractului EP4 (300 μg/mL) – corelat și cu o diminuare a numărului de celule vii și o amplificare a numărului de celule moarte prin efect citolitic. De asemenea, uleiul s-a dovedit, din nou, a avea un neglijabil efect apoptotic și citotoxic la dozele inferioare, cu ușoară tendință crescătoare asupra acestora la dozele de 450 - 600 μg/mL, impactul negativ, nedepășind 9%.

**Tabelul 4.1.**

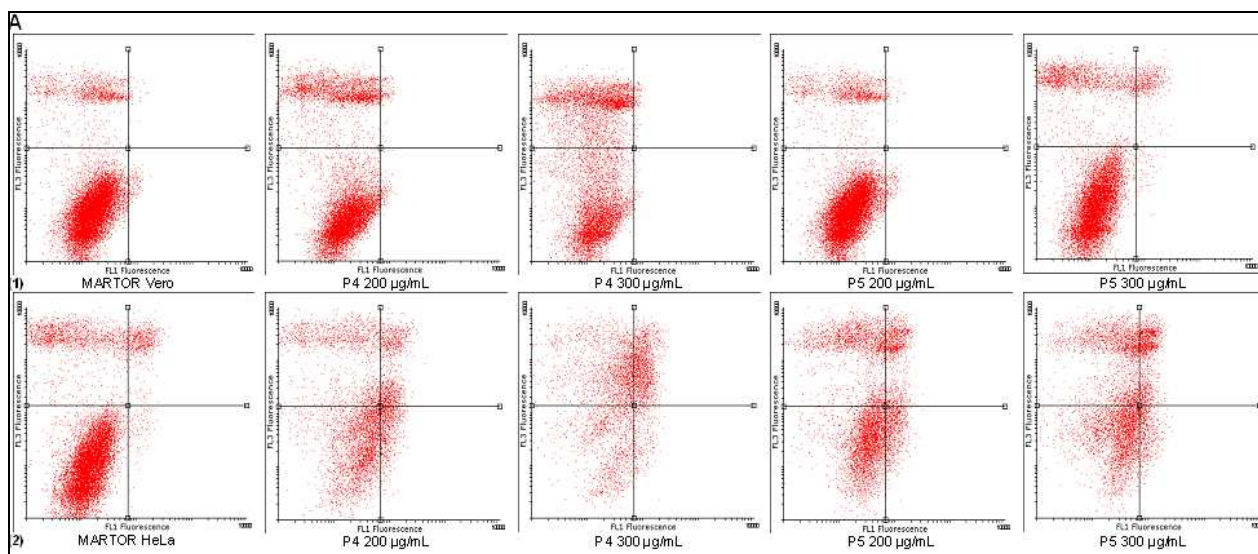
**Nivelul interferenței compusiilor polifenolici din extractele totale primare și a uleiului, citostatic și/sau citotoxic active exprimat de celulele apoptotice și preapoptotice - culturi de celule sanatoase animale Vero**

Lot/ Tratament	Culturi de celule sanatoase animale Vero							
	% Celule vii		% Celule moarte		% Celule apoptotice		% Celule preapoptotice	
	Media ± ES	p<	Media ± ES	p<	Media ± ES	p<	Media ± ES	p<
Martor	94.8±0.9 (5)	-	5.0±0.9 (5)	-	0.03±0.015	-	0.16±0.01	-
EP4 200 μg/mL	76.1±2.4(5)	0.01	23.6±2.3(5)	0.01	0.19±0.06	0.05	0.06±0.01	0.001
EP4 300 μg/mL	41.9±1.1(5)	0.001	58.0±1.1(5)	0.001	0.01±0.01	NS	0.00±0.00	0.001
EP5 200 μg/mL	67.2±1.1(5)	0.001	32.5±1.5(5)	0.001	0.21±0.03	0.001	0.01±0.00	0.001
EP5 300 μg/mL	64.2±1.0(5)	0.001	35.5±1.3(5)	0.001	0.23±0.02	0.001	0.01±0.00	0.001
Martor	98.0±0.1 (5)		1.8±0.2 (5)		0.1±0.02(5)		0.1±0.03(5)	
Ulei 450 μg/mL	88.8±0.6(5)	0.001	9.9±0.6 (5)	0.001	1.1±0.14(5)	0.001	0.2±0.06(5)	NS
Ulei 600 μg/mL	84.0±1.2(5)	0.001	14.9±1.5 (5)	0.001	0.9±0.17(5)	0.001	0.2±0.07(5)	NS

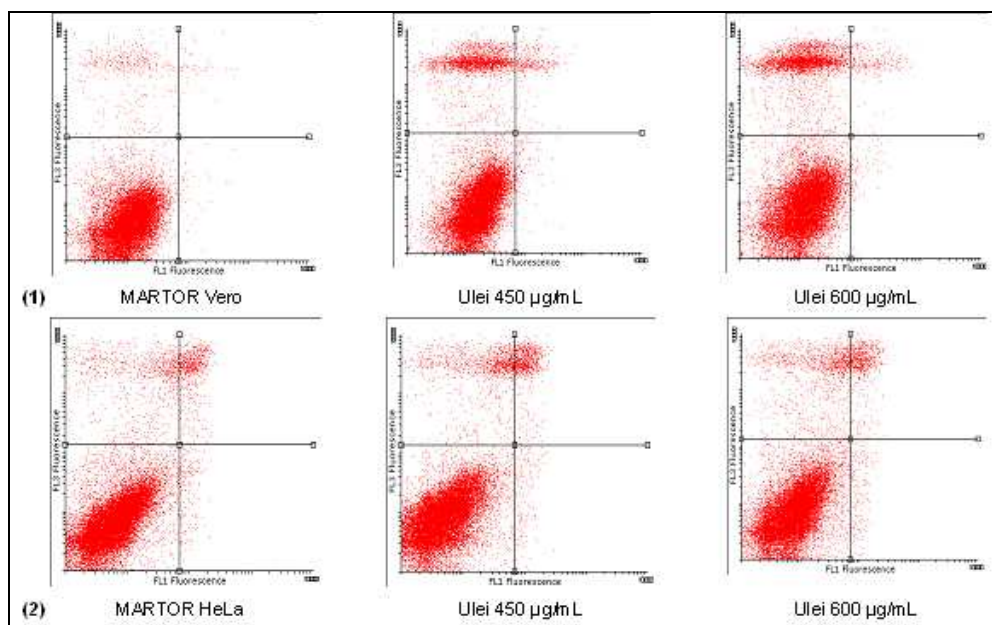
**Tabelul 4.2.**

**Nivelul interferenței compusiilor polifenolici din extractele totale primare și a uleiului, citostatic și/sau citotoxic active exprimat de celulele apoptotice și preapoptotice- culturi de celule tumorale umane HeLa**

Lot/ Tratament	Culturi de celule tumorale umane HeLa							
	% Celule vii		% Celule moarte		% Celule apoptotice		% Celule preapoptotice	
	Media ± ES	p<	Media ± ES	p<	Media ± ES	p<	Media ± ES	p<
Martor	91.2±1.2(5)	-	5.2±1.4(5)	-	3.1±0.2(5)	-	0.4±0.04	
EP4 200 μg/mL	44.6±0.9(5)	0.001	25.8±1.7(5)	NS	16.5±1.0(5)	0.001	13.0±1.0(5)	0.001
EP4 300 μg/mL	26.4±0.8(5)	0.001	41.4±2.1(5)	0.001	28.2±1.3(5)	0.001	4.0±0.4(5)	0.001
EP5 200 μg/mL	51.7±1.3(5)	0.001	25.1±0.6(5)	NS	12.7±0.6(5)	0.001	10.5±0.4(5)	0.001
EP5 300 μg/mL	51.5±2.9(5)	0.001	31.4±3.1(5)	0.05	9.1±0.3(5)	0.001	8.0±1.6(5)	0.01
Martor	92.5±1.6(5)		3.3±0.8 (5)		2.2±0.5 (5)		2.0±1.7 (5)	
Ulei 450 μg/mL	93.9±0.5(5)	NS	4.0±0.4 (5)	0.001	1.7±0.3 (5)	0.001	0.4±0.05(5)	0.001
Ulei 600 μg/mL	92.6±0.6(5)	NS	4.80±0.6 (5)	0.001	2.0±0.4 (5)	0.001	0.6±0.2 (5)	0.001



**Fig. 4 - Citograme reprezentative pentru evidentierea si evaluarea procesului de apoptoza celulara, precum si a numarului de celulelor vii si moarte corespunzatoare, indus celulelor Vero (1) si HeLa ( b) tratate cu diferite doze de extracte polifenolice**



**Fig. 5 - Citograme reprezentative pentru evidentierea si evaluarea procesului de apoptoza celulara, precum si a numarului de celulelor vii si moarte corespunzatoare, indus celulelor Vero (1) si HeLa ( b) tratate cu uleiul din semințe de struguri**

Ansamblul rezultatelor experimentale, referitoare la comportamentul citofiziologic al culturilor celulare Vero, sanatoase si culturilor celulare HeLa, neoplazice, la actiunea bioprodusilor primari (uleiul si extractele polifenolice totale, brute), separate din semințele de struguri, releva – prin prisma variatiilor cantitative ale speciilor reactive de O<sub>2</sub>, ale proteinelor totale, ale numarului de celule vii, moarte, preapoptice si apoptotice – interferenta acestora cu procesele de oxidoreducere, proteinosinteza si apoptoza celulara, aceasta concretizandu-se într-un impact asupra viabilitatii celulare si dezvoltarii culturilor celulare.

De subliniat ca reactivitatea celulara este diferentiata ca sens si intensitate, in functie de natura agentului folosit in tratamentul *in vitro*, doza de tratament si de particularitatile morfologice, structurale, functionale si genetice ale celulelor din componenta culturilor celulare. Astfel, semnalam reactivitatea crescuta a celulelor canceroase – cu semnificatie citostatice, biomedicala, in cazul dozelor superioare ale

extractelor polifenolice totale – și redusă a celulelor sănătoase – ce subliniază buna tolerabilitate, citotoxicitate minimă în special a uleiului cu valoare alimentară și cosmetică, a drogurilor.

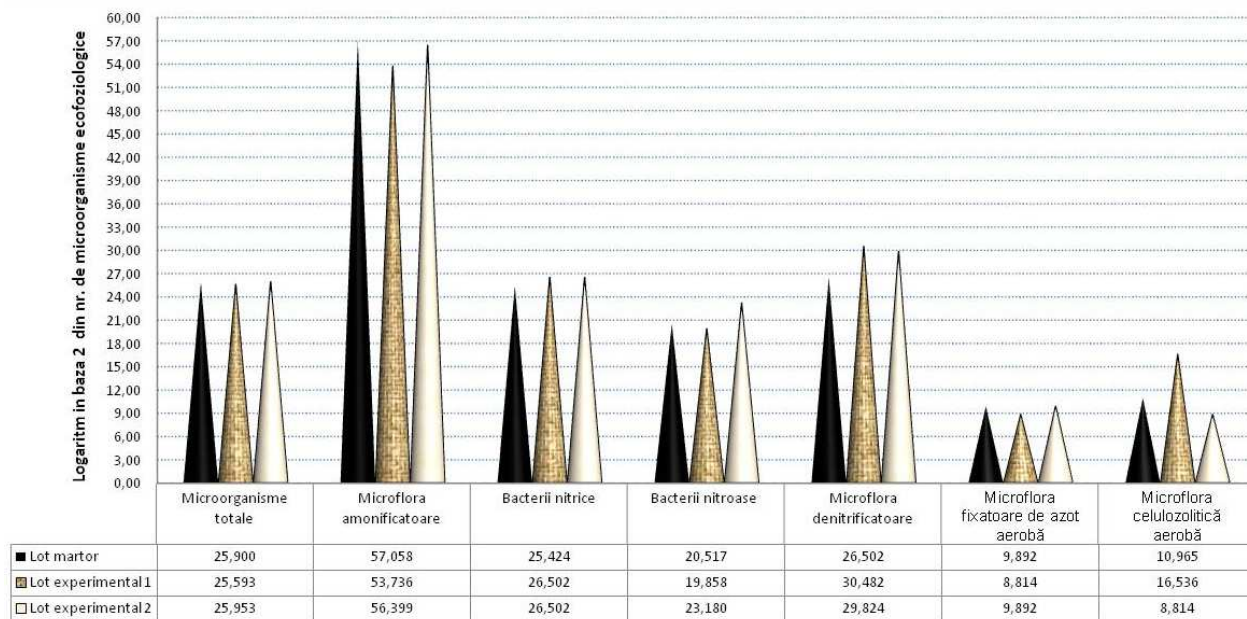
**Activitatea I 11. Determinarea grupelor ecofiziologice de microorganisme în loturile experimentale în vederea aprecierii calității de fertilizator a rezidului vegetal rezultat din procesele extractive.**

Acest studiu a demarat înainte de apariția înghețului la sol. Studiul oferă informațiile preliminare în care se vor desfășura procesele de biodegradare a deșeurilor de semințe rezultat din procedeele extractive ale uleiului și a compușilor polifenolici.

Activitățile desfășurate în acest an au vizat:

- ✓ Organizarea în teren a loturilor experimentale pentru testarea calității de fertilizator a deșeurilor vegetal rezultat din procesele extractive;
- ✓ Monitorizarea factorilor climatici;
- ✓ Caracterizarea tipului de sol din loturile experimentale;
- ✓ Determinarea indicilor hidrofizici ai solului;
- ✓ Dinamica elementelor chimice din sol în loturile experimentale;
- ✓ Determinarea grupelor ecofiziologice de microorganisme în loturile experimentale.

În solurile analizate, a fost determinat numărul de microorganisme aeriene totale cât și cel al microorganismelor amonificatoare, nitrificatoare (nitrică, nitroasă), denitrificatoare, fixatoare de azot și celulolitică aerobă. Rezultatele obținute sunt reprezentate grafic în figura 6.



**Fig. 6 - Logaritmi în baza 2 din numărul de microorganisme ecofiziologice determinate în probele de sol prelevate din loturile experimentale**

Conform datelor reprezentate grafic, numărul de microorganisme din microflora totală aerobă exprimat prin logaritmi în baza 2, a fost foarte apropiat în solul loturilor experimentale, fiind cuprins între 25,900 – 25,953.

Numărul de microorganism amonificatoare/g sol, a fost apropiat în două parcele, și anume în lotul martor și lotul experimental 2, respectiv 56,389 și 57,038. În lotul experimental 1 numărul de microorganisme amonificatoare exprimat în logaritmi în baza 2 a fost mai mic cu 5,78%, față de lotul martor și cu 4,72% față de lotul experimental 2.

Numărul de microorganisme nitrică/g sol a fost identic în lotul 1 și 2 respectiv 26,502, și mai mic în lotul martor respectiv 25,424. Rezultatele obținute în evaluarea bacteriilor nitroase se remarcă prin diferențe, valorile obținute fiind 20,517 în lotul martor, 19,858 în lotul experimental 1 și 23,180 în lotul experimental 2.

Aprecierea numărului de bacterii denitrificatoare/g sol a fost diferită în loturile analizate și anume cea

mai mare valoare de 26,502 s-a determinat în lotul martor și valori apropiate în loturile experimentale 1 și 2 respectiv 30,482 și 29,824.

În ceea ce privește numărul de microorganisme aerobe fixatoare de azot /g sol, acesta, ca valoare a fost foarte puțin diferit, valorile determinate fiind de 9,892, 8,814, și 9,892.

Evaluarea microorganismelor celulozolitice aerobe relevă diferențe semnificative între loturile experimentale. Cea mai mică valoare de 8,814 s-a înregistrat în lotul experimental 2, iar cea mai mare valoare s-a înregistrat în lotul experimental 1 și anume de 16,536. În cazul lotului martor, numărul de microorganisme celulozolitice a fost de 10,965.

În ansamblu, rezultatele obținute privind reprezentarea grupelor ecofiziologice în loturilor experimentale, în care se va testa calitatea de fertilizator a rezidului vegetal rezultat din procesele extractive, considerăm că microbiota prezentă în sol este, la finalul perioadei de vegetație în plantații, mediu reprezentată.

**Activitatea I.12. Intreținere loturi experimentale, recoltare și procesare struguri, selectare seminte de struguri.** Partenerul cofinanțator, SC Cotnari SA a susținut derularea activităților de cercetare din planul de lucru, realizând întreținerea loturilor experimentale, recoltarea și procesarea strugurilor în vederea selectării semințelor.

### **Concluzii**

Numeroasele și variatele rezultate experimentale, inserate în tabele sintetice și ilustrate grafic indica rezolvarea dezideratelor științifice prevazute de aceasta prima etapă a cercetărilor, confirmând cercetările semnalate în literatură de specialitate și trasează viitoarele direcții de investigare preconizate în planul de activități ale etapei II/2015. Rezultatele primei etape urmează a fi diseminate prin publicarea lor sub forma de articole de specialitate în reviste naționale și internaționale recunoscute CNCSIS și/sau cu factor de impact.

### **Bibliografie:**

- 1) Raport științific și tehnic în extenso al coordonatorului - CO;
- 2) Raport științific și tehnic în extenso al partenerului P1;
- 3) Raport științific și tehnic în extenso al partenerului P2;
- 4) Raport științific și tehnic în extenso al partenerului P3;