



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00097**

(22) Data de depozit: **08/03/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/07/2021 BOPI nr. **7/2021**

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA VALAHIA DIN
TÂRGOVIŞTE, ALEEA SINAIA, NR. 13,
TÂRGOVIŞTE, DB, RO;
• HYPERICI FARM S.R.L.,
STR.MAIOR EUGEN BREZISEANU, BL.24,
PARTER, TÂRGOVIŞTE, DB, RO

(72) Inventatori:
• RĂDULESCU CRISTIANA,
STR. JUSTIȚIEI NR. 23, TÂRGOVIŞTE, RO,
RO;
• NICOLESCU CRISTINA MIHAELA,
STR.SOARELUI, NR.17, TÂRGOVIŞTE, DB,
RO;

• OLTEANU RADU LUCIAN,
BD.MIRCEA CEL BĂTRÂN, BL.3, BL.A1,
SC.D, AP.62, TÂRGOVIŞTE, DB, RO;
• BUMBAC MARIUS,
STR.GRIGORE BĂLEANU, NR.106,
SAT BĂLENI ROMANI, COMUNA BĂLENI,
DB, RO;
• BURULEANU CLAUDIA LAVINIA,
STR.CERNĂUȚI, NR.5, BL.E9, SC.A, AP.10,
TÂRGOVIŞTE, DB, RO;
• GORGHIU LAURA MONICA, BD.UNIRII,
NR.19, BL.64, SC.B, ET.2, AP.52,
TÂRGOVIŞTE, DB, RO;
• HOLBAN CARMEN GEORGETA,
STR.POPOA ŞAPCĂ, NR.13, TÂRGOVIŞTE,
DB, RO

(54) **CREMĂ EMOLIENTĂ PENTRU TEN USCAT CU EXTRACT DE PIELIȚĂ/ SÂMBURE (CULTURĂ ECOLOGICĂ VITIS VINIFERA L., SOIUL FETEASCĂ NEAGRĂ)**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o cremă emolientă pentru ten uscat și la un procedeu de obținere a acesteia cu aplicabilitate în domeniul cosmetic sau dermatologic, în principal în scop antirid. Crema, conform inventiei, este constituită din 7% (volum/masă) extract hidroalcoolic din pielitză/ sâmbure de struguri de *Vitis vinifera L.*, soiul Fetească Neagră, cultivat ecologic, într-o bază de cremă de tip amestec de lanolină, alcool cetilic și lauril sulfat de sodiu. Procedeul, conform inventiei constă în etapele de: 1 - extractia compusilor activi din pielitză/ sâmbure provenite din fructe sau biomasă proaspătă, în solvent de extractie etanol-apă, prin macerarea la temperatura camerei, timp de 24 h, din care primele 3 h sub agitare mecanică, urmată de filtrare, extractul rezultat având un conținut de 2,5...3,5 mg EAG/ml (pielitză), respectiv 4,5...7,5 mg EAG/ml (sâmbure) compuși polifenolici,

3...4,5 mg EQt/ml (pielitză), respectiv, 4,2...7,7 mg EQt/ml (sâmbure) flavonoide, activitate antioxidantă în domeniul 0,8...1,5 mg EAA/ml (pielitză), respectiv, 10...12,5 mg EAA (sâmbure), activitate antibacteriană și antifungică, 2 - prepararea bazei de cremă prin amestecarea la 50°C a 15% alcool cetilic, 20% lanolină, 1% lauril sulfat de sodiu și în rest, apă distilată, cu omogenizare continuă până la răcire, 3 - înglobarea extractului lichid în baza de cremă, din care rezultă un produs de tip cremă cu efect hidratant, revitalizant și antirid, pentru un spectru larg de tipuri de ten uscat.

Revendicări: 4

Figuri: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de inventie a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de inventie este determinată de revendicările continute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



RO 135101 A0

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENTII SI MARCI
Cerere de brevet de inventie
Nr. a 20 00097
Data depozit ..08.-03-2021....

**CREMĂ EMOLIENTĂ PENTRU TEN USCAT CU EXTRACT DE PIELITĂ/SÂMBURE
(CULTURĂ ECOLOGICĂ VITIS VINIFERA L., SOIUL FETEASCĂ NEAGRĂ)**

Invenția se referă la o CREMĂ EMOLIENTĂ PENTRU TEN USCAT CU EXTRACT DE PIELITĂ/SÂMBURE (CULTURĂ ECOLOGICĂ VITIS VINIFERA L., SOIUL FETEASCĂ NEAGRĂ) cu aplicabilitate în domeniul cosmetic sau dermatologic, în principal în scop antirid. Conform inventiei, crema conține lanolină, alcool cetilic, lauril sulfat de sodiu, extract hidroalcoolic din pielită și/sau sâmbure de struguri din cultură ecologică de *Vitis vinifera* L., soi românesc Fetească Neagră. Din asocierea componentelor din cremă rezultă un produs care hrănește profund și previne uscarea pielii (efect hidratant, revitalizant, antimicrobial), repară și netezește linii de expresie fine, previne îmbătrânirea (efect antirid).

Soiul autohton de Fetească Neagră, este soiul de struguri din România cu cel mai ridicat potențial calitativ, cu aromă deosebită și un conținut de taninuri fine. Acest soi valoros este foarte vechi, cunoscut încă din vremea dacilor, adaptat bine atât la condițiile de cultură (câmpiedeal) cât și la cele climatice, fiind rezistent atât la ger cât și la secetă. Reprezentativ pentru soiul Fetească Neagră este faptul că este autofertil (soi timpuriu), fiind astfel cultivat în plantații pure, ecologice (cultură organică), fără a modifica profilul fitochimic al strugurelui. Conform brevetului RO129328A2 [Ranca, A.M. și Negru, A., 2015] (*Procedeu ecologic de cultivare a soiului de viță de vie "fetească neagră"*), care se referă la un procedeu de cultivare ecologică a soiului de viță de vie Fetească Neagră aplicat într-o fermă viticolă, tratamentele fitosanitare și cele de fertilizare aplicate mai multor soiuri de viță de vie pentru a le eficientiza și adapta la condițiile deficitului de apă au totuși dezavantajul că se realizează cu o serie de produși chimici de sinteză care, chiar dacă sunt de tip sistemic și se aplică în limitele permise de legislația relevantă, alterează proprietățile strugurilor. Prin aplicarea inventiei mai sus menționate se precizează mai multe avantaje, printre care și obținerea unor struguri

naturali, fără reziduuri de substanțe chimice. În brevet se evidențiază faptul că este interzisă folosirea produselor de sinteză pentru tratamente fitosanitare, iar sănătatea plantelor se asigură într-o manieră preventivă, fiind permise doar produsele bazate pe săruri minerale simple (cupru, sulf, silicat de sodiu) sau extractele de plante, în limitele normelor stabilite de legislația relevantă (Regulamentele CE nr.834/2007 și nr.889/2008).

Strugurii, tescovina și vinurile din soiurile roșii de *Vitis vinifera* L. sunt surse importante de antioxidați naturali, datorită concentrației ridicate de diferiți compuși fenolici [Balea, Ş.S., și colab., Oxid. Med. Cell. Longev., 2018; Manach, C., și colab., Am. J. Clin. Nutr., 2004, 79, 727]. Aproximativ 70% din compușii fenolici au fost raportați că rămân în tescovină [Mattos, G.N., și colab., J. Sci. Food Agric., 2017, 97, 1055]. Majoritatea polifenolilor din struguri provin din pieliță și sâmburi și includ cuprind două clase principale: flavonoide (antociani, flavonoli, flavan-3-oli, flavone și chalcone) și nonflavonoide (acizi fenolici, stilbeni, tanini, cumarine și neolignani) [Xu, I., și colab., Food Sci. Nutr., 2016, 4, 125]. Mai mult, în cazul compușilor polifenolici, s-a constatat că aceștia au proprietăți antioxidantă, dar pot acționa și ca prooxidanți, deoarece pot induce generarea de radicali liberi [Cotoras, M., și colab., Molecules, 2014, 19, 21154]. Evaluarea comparativă a activității antioxidantă pentru tescovina nefermentată și cea fermentată, a indicat o corelare semnificativ pozitivă activității antioxidantă cu concentrația taninurilor, conținutul total de antociani, monomeri flavan-3-ol și stilbeni [Balea, Ş.S., și colab., Oxid. Med. Cell. Longev., 2018].

În 2014 un raport privind evaluarea siguranței utilizării în cosmetică a 24 ingrediente derivate din struguri (*Vitis vinifera* L.) [Fiume, M.M., și colab., Int. J. Toxicol., 2014, 33, 48S] preciza utilizarea frecventă a unor ingrediente precum extractul de pieliță – "Vitis Vinifera (Grape) Skin Extract" – și cel de sâmburi – "Vitis Vinifera (Grape) Seed Extract", ca agenți de condiționare ai pielii, iar unele dintre aceste ingrediente pot funcționa ca antioxidați, agenți de aromatizare și/sau coloranți. Fenoli ocupă locul trei din punct de vedere al abundenței în struguri (după carbohidrați și acizi), fenoli total extractibili fiind prezenti în proporții variabile în funcție de partea anatomică a fructului: sub 10% în pulpă, 60-70% în sâmburi și respectiv 28-35% în pieliță [Fiume, M.M., și

colab., Int. J. Toxicol., 2014, 33, 48S]. Este menționat de asemenea faptul că cantitatea de constituenți prezenti în extract depinde de solventul folosit pentru extractie și de varietatea/soiul de *Vitis vinifera* L. utilizată. Principalii constituenți ai sâmburilor de struguri sunt compușii fenolici reprezentați, pe baza extractelor de sîmburi de struguri standardizate, în proporție de 92-95% de proantocianidine oligomerice [National Toxicology Program, Summary of Data for Chemical Selection, 2000]. Extractul de sâmburi funcționează ca agent anticarie, antimătreață, antifungic, antimicrobian, antioxidant, agent aromatizant, stabilizator la lumină, agent pentru îngrijire/sănătate orală și agent de protecție solară. Extractul de pieleță funcționează ca antioxidant, colorant și agent aromatizant. Ambele extracte se încadrează în clasa chimică a produselor botanice și derivatelor botanice [Personal Care Products Council, On-Line INFOBASE Ingredient Database, 2012].

Extracția polifenolilor este dependentă, în principal de doi factori, dizolvarea fiecărui compus polifenolic la nivel celular în matricea materialului vegetal și difuzia în mediul extern (solvent) [Kallithraka, S., și colab., Phytochem. Anal., 1995, 6, 265; Nawaz, H., și colab., Sep. Purif. Technol., 2006, 48, 176]. Inițial, extracțiile erau efectuate cu solvenți organici însă deși aceste proceduri de extracție au fost eficiente, extractele nu au fost sigure pentru uz uman din cauza efectelor toxice potențiale ale solventului rezidual; au fost utilizati solvenți cum ar fi combinații hexan și metanol [Santos-Buelga, C., și colab., Food Chem., 1995, 53, 197], combinații etanol-benzen [Kofujita, H., și colab., Wood Sci. Technol., 1999, 33, 223], acetat de etil [Bonilla, F., și colab., Food Chem., 1999, 66, 209] și dioxid de sulf [Cacace, J.E., și colab., J. Agric. Food Chem., 2002, 50, 5939]. Acești solvenți sunt toxici pentru organismul uman în funcție de doza utilizată, aceste potențiale efecte asupra sănătății constituind unul din motivele cercetării metodelor care ar reduce utilizarea solvenților organici în procedura de extracție [Nawaz, H., și colab., Sep. Purif. Technol., 2006, 48, 176]. Selectarea etanolului ca solvent organic s-a bazat pe faptul că etanolul, în amestec cu apă, îmbunătățește solubilitatea compozițiilor bioactivi în comparație cu apa pură [Nawaz, H., și colab., Sep. Purif. Technol., 2006, 48, 176]. Soluția optimă constă dintr-un amestec de 50% etanol – 50% apă (v/v); în plus, etanolul este un solvent biologic sigur,

spre deosebire de solventii organici menționați anterior. Prezența etanolului în amestec contribuie la penetrarea solventului în zonele hidrofobe ale matricei sămburilor și la precipitarea proteinelor solubile din sărnuri care ar interfera cu procedura de filtrare [Shi, J., și colab., *J. Food Agric. Environ.*, 2003, 1, 42]. Deși numeroase studii au indicat că utilizarea acetonei și metanolului conduce la randamente ridicate de extracție ale polifenolilor individuali, amestecurile hidroetanolice au prezentat un grad de recuperare mai ridicat raportat la polifenolii totali [Bogdan, C., și colab., *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9, 502; Nieto, J.A., și colab., *Foods*, 2020, 9, 604; Li, J., și colab., *J. Food Sci. Technol.*, 2019, 56, 4879; Moldovan, M., și colab., *Farmacia*, 2020, 68, 15].

Cremele antirid/antiîmbătrânire sunt produse predominant de îngrijire a pielii pe bază de creme hidratante, segmentul produselor topice formulate cu adăos de componente naturale manifestând un interes în creștere din partea consumatorilor relativ la sănătate și aspect [Soto, M.L., și colab., *Cosmetics*, 2015, 2, 259; Nolan, K.A., și colab., *J. Drugs Dermatol.*, 2012, 11, 220; Sharma, B., și colab., *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2012, 4, 57]. Creșterea acestui segment al pieței are la bază și cererea populației care optează pentru alternative mai puțin invazive, non-chirurgicale, pentru a încetini efectele îmbătrânirii asupra pielii. În ceea ce privește compușii activi, tendințele actuale ale produselor cosmetice înregistrează două direcții: o întoarcere în trecut și un nou început, cu utilizarea ingredientelor tradiționale și beneficiile cercetării moderne și a produselor testate clinic [Cohen-Letessier, A., *Ann. Dermatol. Venereol.*, 2009, 136, S367]. Polifenolii naturali, prin activitatea antioxidantă confirmată relativ la speciile de oxigen radicalice, prezintă un interes constant în domeniul cosmetic în scopuri antiîmbătrânire sau pentru aplicații nutraceutice. Strugurele furnizează ingrediente active capabile să contracareze simptomele îmbătrânirii epidermice, cum ar fi componentele fenolice, care pot îmbunătăți protecția împotriva radiațiilor solare și activitatea antioxidantă epidermică [Soto, M.L., și colab., *Cosmetics*, 2015, 2, 259; Lorencini, M., și colab., *Ageing Res. Rev.*, 2014, 15, 100]. Cremele pe bază de struguri/derivate sunt eficiente în îmbunătățirea îmbătrânirii premature [Sharif, A., și colab., *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2015, 37, 253] și ar putea reduce apariția cancerului de piele și întârzia procesul de fotoîmbătrânire [Saraf, S., și colab., *Pharmacogn. Rev.*, 2010, 4,

1]. Terapia ce folosește compuși bioactivi asociați produselor derivate din struguri a fost propusă pentru tratamentul proceselor extrinseci de îmbătrânire a pielii [Sanchez, V., și colab., Ars Pharm., 2008, 49, 309; Ratz-Lyko, A., și colab., Phytother. Res., 2015, 29, 509]. Noile fitoproduse pentru întinerirea pielii prezintă un interes crescut, într-un studiu care a evaluat cremele antiîmbătrânire comercializate, extractul de sâmburi de struguri constituind unul din cele mai utilizate ingrediente [Cronin, H., și colab., J. Cosmet. Dermatol., 2010, 9, 218].

Pentru tratamentul tenului uscat se folosesc în general creme pe bază de compuși chimici de sinteză, unii toxici, cancerigeni (categoria paragenilor, izotiazolinone, bronopol, dimetilol hidantoină sau diazolidinil uree etc). Dată fiind preferința generală a consumatorilor pentru produse naturale și grija acordată de către forumurile internaționale, referitoare la interzicerea compușilor de sinteză în compoziția produselor cosmetice folosite zilnic/săptămânal, inventia oferă consumatorilor și o soluție legată de chemofobie. Un alt aspect, ar fi utilizarea extractului din soiul autohton, extrem de apreciat, Fetească Neagră, un soi fără modificări genetice, secular, cultivat în podgorii ecologice, pe soluri fără poluare istorică, irigare în picătură și tratamente naturale periodice, fără fertilizatori artificiali. Compoziția chimică deosebită a acestui soi, Fetească Neagră, cu un conținut de resveratrol ("elixirul tinereții") și piceid (glucozid stilbenoid – derivat major al resveratrolului) remarcabil, aşa cum arată analiza cantitativă HPLC, cu efect antiîmbătrânire, revigorant, ar putea fi o alternativă sigură și mult mai bine primită de consumatorii din România și din alte țări.[citare necesară]

Sunt cunoscute din **stadiul anterior al tehnicii produse/compoziții** cum ar fi:

Documentul WO 2012/056052 A1 [Moro Gonzalez, L.C., și colab. 2012] ("Polyphenolic grape extract and cosmetic product comprising said extract") / PCT/ES2010/070689, care se referă la un extract polifenolic de struguri caracterizat prin aceea că are următoarele specificații tehnice: un index polifenolic total (TPI) cuprins între 100 și 1000; un conținut polifenolic exprimat ca echivalenți de acid galic între 2 și 25 mg de acid galic/L; și un pH cuprins între 2 și 4. Invenția se referă, de asemenea, la o compoziție cosmetică ce cuprinde extractul menționat și, de asemenea, la utilizarea acestuia pentru producerea unor articole cosmetice. Ca materie primă

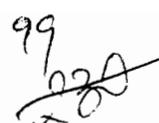
pentru obținerea extractului este posibil să se utilizeze diferite soiuri de struguri, deși sunt preferat în special strugurii roșii. De regulă, aceste extracte provin din pieleță după presarea strugurilor. Din extractul de polifenolic de struguri obținut și caracterizat aşa cum s-a descris anterior, au fost realizate compozиii cosmetice pentru administrare topică, folosind metode convenționale, printre care și o cremă hidratantă. Aceasta conține extractul polifenolic descris într-o concentrație de 2-10% din greutate, dar și cel puțin un vehicul constând din excipienti acceptabili din punct de vedere cosmetic, cum ar fi ulei de trandafir, extract de caviar, ulei de jojoba și germenii de grâu.

Documentul ES2228284B1 [Quilis, L.J. și Casani, A.S., 2003] ("Composiciones que comprenden un extracto de hollejo, semillas y raspas de uva negra") se referă la extractul natural din pieleță, semințe și resturi de struguri negri, bogat în compuși antioxidanti (polifenoli și antociani), ce poate fi utilizat la prepararea produselor alimentare neactive îmbogățite cu antioxidanti naturali, precum și în prepararea compozиiilor dietetice, farmaceutice sau cosmetice. Extractul natural concentrat poate fi obținut prin percolare care presupune într-o primă etapă un proces de extracție solid-lichid (utilizând ca materie primă un amestec de pieleță, sâmburi și resturi de struguri negri, iar ca solvent apa) pentru a obține un extract brut; separarea fracțiunii cuprinzând componentele antioxidantante (polifenoli și antociani) din extractul brut pentru a obține un extract concentrat, și, optional, un proces de uscare sau îndepărtare a solventului pentru a obține extractul concentrat sub formă de pulbere uscată. Într-o realizare particulară, o compozиie cosmetică furnizată de această invenție include un vehicul care cuprinde unul sau mai mulți excipienti cosmetici acceptabili; autorii prezentei invenții au observat că respectivul extract este absorbit percutanat, permitând utilizarea acestuia în administrarea topică. Un exemplu de astfel de compozиie cosmetică tip cremă conține: extract uscat de *Vitis vinifera*, extract glicolic de *Fucus vesiculosus*, extract glicolic de *Centella asiatica*, alantoină, extract glicolic *Ginkgo biloba*, vitamina E, emulsie O/A.

Documentul WO 2010/056675 A2 [Jacobs, J., June Jacobs Labs, 2012] ("Antioxidant compositions for the cleansing and conditioning of skin") / PCT/US2009/063891, se referă la compozиii cosmetice antioxidantante pentru îngrijirea

pielii formulate pentru a combate afecțiunile asociate cu deteriorarea produsă de radicalii liberi și stresul oxidativ. Compozițiile conțin unul dintre mai mulți agenți activi, inclusiv un agent derivat de la una sau mai multe dintre speciile de plante: *Lycium barbarum*, *Punica granatum*, *Vitis vinifera*, *Aspalathus linearis* și *Camellia Sinensis*, precum și vehiculi acceptabili din punct de vedere cosmetic; aceste compozitii cosmetice își găsesc aplicabilitatea în îmbunătățirea aspectului pielii îmbătrânite sau deteriorate. Într-o formă de realizare, agentul activ este lichid, pulbere fin măcinată sau un extract derivat dintr-o componentă a unuia sau mai multora dintre soiurile de plante enumerate mai sus. În consecință, o compoziție poate include ca agenți activi, componente din oricare sau din toate soiurile de plante menționate mai sus în orice cantitate sau combinație, pentru a obține efectul de întinerire a pielii prin aplicare locală. De exemplu, în anumite variații, o compoziție poate conține de la aproximativ 0,001% până la aproximativ 20% dintr-un extract derivat din una sau mai multe dintre speciile *Lycium barbarum*, *Punica granatum*, *Vitis vinifera*, *Aspalathus linearis* și/sau *Camellia Sinensis*, ca ingredient activ. Compozițiile pot include un vehicul acceptabil din punct de vedere cosmetic pentru a acționa ca diluant, dispersant sau purtător pentru ingrediente active, astfel încât să faciliteze distribuția și absorbția acestora atunci când compoziția este aplicată pe piele. Astfel de vehicule pot fi apă, emolienți lichizi sau solizi, alți solvenți, umectanți, agenți de îngroșare, pulberi și parfumuri; de exemplu, un purtător adecvat poate include glicerină, butilenglicol, propilenglicol, apă, diverse uleiuri (jojoba, migdale, soia, floarea soarelui, caise etc.) și altele asemănătoare.

Documentul WO 2011/055222 A2 [Bergamini, E., și colab. 2011] ("Composition comprising an extract from *polygonum cuspidatum* and a polyphenolic extract from red *vitis vinifera*") / PCT/IB2010/002812, se referă la o compoziție care include un extract solubil în apă de *Polygonum cuspidatum* și un extract (soi de struguri roșii) de *Vitis vinifera* și utilizări ale acesteia. Compoziția conform invenției cuprinde un extract de *Polygonum cuspidatum* care conține *trans*-resveratrol și un extract polifenolic de *Vitis vinifera* în proporții relative cuprinse între 1% și 25% (procente masice) fiind revendicată pentru uz dermatologic (antiîmbătrânire). În cuprinsul brevetului menționat, expresia "extract" este înțeleasă ca însemnând un fito-compozit care cuprinde toate



componentele prezente în *Vitis vinifera* "roșie" corespunzătoare echilibrului lor natural. De preferință, extracția se efectuează utilizând o "metodă hidroalcoolică" care nu introduce compuși chimici care dăunează sănătății umane; prin urmare, această definiție include polifenoli care sunt produși în mod natural (de exemplu, prin extracție din vin roșu sau struguri roșii). Compoziția în forma topică poate fi formulată preferabil sub formă de cremă, gel sau unguent. Un exemplu de componență sub formă de cremă include: glicerină monostearat, alcool cetilic, ulei mineral, ulei de susan, glicerină, extract polifenolic din soi roșu de *Vitis vinifera*, extract de *Polygonum cuspidatum*, resveratrol adăugat, apă.

Documentul RO121004B1 [Maftei, E.A., și colab. 2006] ("Compoziție cosmetică cu acțiune antiselulitică și de reducere a depunerilor adipose") se referă la o componență cosmetică cu acțiune antiselulitică și de reducere a depunerilor adipose, cu extracte vegetale, ce constă în aceea că are în componență 3...8 părți extract hidroalcoolic de *Vitis vinifera*, conținând minimum 2,5% substanță uscată, părțile fiind exprimate în greutate. Componență cosmetică, conform invenției, datorită complexului bioactiv vegetal, asigură hidratarea epidermei și stopează procesele de îmbătrânire a pielii, datorită asocierii complexului bioactiv vegetal cu adjuvanții cosmetici și apă. Un exemplu de cremă antiselulitică, hidratantă are în componență: lanolină anhidră, alcool cetilic, ceară galbenă, cetil fosfat de dietanol amoniu, extract hidroalcoolic de iederă, extract hidroalcoolic de viță de vie, extract hidroalcoolic de șovârf, ulei vegetal, ulei de levănțică, apă distilată, conservanți/antioxidanți.

Documentul RO127720B1 [Postescu, I.D., și colab. 2016] ("Gel fotochemoprotector și procedeu de preparare a acestuia") se referă la o componență pentru un gel cu proprietăți de fotochemoprotecție, destinat aplicării topice pentru uz cosmetic, în vederea protejării pielii față de efectele nocive ale radiațiilor ultraviolete, și la un procedeu de preparare a acestuia. Invenția combină un extract natural, obținut din semințe de struguri, varietatea Burgund Mare, și ingrediente simple și ieftine, care asigură o bună pătrundere a extractului în piele (polimer carboxivinilic cu greutate moleculară mare, de exemplu, carbopol, trietanolamină, glicerină, p-hidroxibenzoat de metil). Componența farmaceutică a produsului prezentat în invenție își menține

stabilitatea fizică și chimică o perioadă lungă de timp. Efectele gelului fotochemoprotector la nivelul pielii sunt multiple: reduce efectul radicalilor liberi generați de expunerea la radiații ultraviolete asupra componentelor din piele (acizi nucleici, lipide, proteine), inhibă apariția de mutații în celulele normale și îmbunătățește repararea ADN-ului. Într-un alt aspect, inventia se referă la un procedeu de preparare a unui gel fotochemoprotector definit mai sus, în care peste un polimer carboxivinilic cu masă moleculară mare, dispersat într-un amestec format din apă și glicerină, și menținut în repaus pentru hidratare, se adaugă treptat, sub agitare, trietanolamină dizolvată în apă, iar peste acest amestec se adaugă un amestec format din esterii metilic și propilic ai acidului p-hidroxibenzoic, dizolvăți în alcool, și un extract fluid de sămburi de struguri obținut din 1 parte în greutate semințe uscate și măcinate sub formă de pulbere fină, reluată cu 10 părți în volum soluție etanol - apă, 60% (v/v), care se refluxează apoi pe baie de apă, se răcește la temperatura camerei și se filtrează, apoi se completează la 100 de părți cu apă distilată și se omogenizează. Procedeul de obținere a extractului din semințe de struguri roșii (*Vitis vinifera L.*), varietatea Burgund Mare, este următorul: 1 parte în greutate semințe, uscate și măcinate sub formă de pulbere fină, s-au reluat cu 10 părți în volum soluție etanol - apă, 60% (v/v), și amestecul s-a refluxat pe baie de apă, timp. După răcire (la temperatura camerei) și îndepărțarea prin filtrare a fracțiunii solide, filtratul a fost analizat pentru evaluarea conținutului în polifenoli totali, proantocianidine, antiociani, și activitatei antioxidantă (AO). Randamentul la extractie, în polifenoli totali, a fost cuprins între 9,2 și 9,8 g EAG/L (EAG = echivalent acid galic). S-au efectuat cercetări experimentale privind toleranța gelului fotochemoprotector cu extract de sămburi de struguri. A fost aplicat în patch-teste la subiecți voluntari sănătoși, rezultatele obținute fiind foarte bune, fără a apărea reacții locale și la distanță de intoleranță.

Documentul RO122894B1 [Burghelea, B., și colab. 2010] ("Procedeu de obținere, din semințe de struguri, a unui extract sub formă de pulbere, cu un conținut ridicat de proantocianidine") se referă la un procedeu de obținere, din semințe de struguri, a unui extract sub formă de pulbere, cu un conținut ridicat de proantocianidine, extract care poate fi utilizat în domeniile farmaceutic, alimentar și cosmetic. Procedeul

conform invenției constă în aceea că se tratează struguri cu apă și/sau alcool etilic, la o temperatură de până la 120°C și o presiune de 1 atm, timp de 45...60 min, după care extractul polifenolic în soluție de alcool etilic, bogat în proantocianidine, se concentrează, se supune centrifugării și se filtrează, obținându-se un extract care, ulterior, se purifică și se îmbogățește prin trecerea pe o coloană cromatografică având fază inversă, iar ulterior obținerea unei pulberi prin liofilizarea extractului lichid total sau a extractului lichid îmbogățit. Rezultatele experimentelor toxicologice pe animale precum și prezentarea sa farmaceutică (pulbere fină nehidroscopică, cu mare stabilitate în condiții atmosferice normale), recomandă extractul polifenolic ca fiind sigur pentru utilizarea sa ca ingredient în produse cosmetice.

Soluțiile tehnice din procedeele/produsele prezentate mai sus prezintă următoarele dezavantaje:

- Un conținut polifenolic total exprimat ca miligrame echivalent acid galic per mL extract (mg-EAG/mL) semnificativ redus (brevet WO 2012/056052) comparativ cu cel determinat în cazul extractului revedicat în prezenta invenție; de asemenea valorile pH-ului extractului polifenolic de struguri utilizat ca ingredient al compozițiilor cosmetice (tip cremă hidratantă) nu sunt relativ apropriate (brevet WO 2012/056052) de valoarea medie (4,7) a pH-ului "natural" al epidermei umane [Lambers, H., și colab., Int. J. Cosmet. Sci., 2006; Rogiers, V., Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol., 2001].
- Utilizarea unuia sau mai multor ingrediente active (extracte naturale), deși având la bază produși naturali (ex. ulei de trandafir, extract de caviar, germenii de gâu, extracte glicolice de *Fucus vesiculosus*, *Centella asiatica* etc.) pot induce interacții specifice cu compușii fitochimici din extractul de *Vitis vinifera*; nu se precizează compatibilitatea altor ingrediente active naturale adăugate cu extractul de piele/sâmburi de struguri (brevet WO 2012/056052, brevet ES2228284B1, brevet WO 2010/056675 A2, brevet WO 2011/055222 A2, brevet RO121004B1).
- Extractia solid-lichid utilizând ca solvent numai apa (chiar în cazul utilizării ca materie primă a unui amestec de piele/sâmburi și resturi de struguri) conduce la randamente scăzute de extracție ale compușilor polifenolici comparativ cu utilizarea amestecurilor hidroalcoolice; nu se precizează valorile indexului polifenolic total sau

conținutului polifenolic total în cazul extractului de *Vitis vinifera* în formă lichidă sau pulbere (brevet ES2228284B1).

- Domeniul larg de concentrație (ex. 0,001–20%, 1–25%) specificat pentru utilizarea extractului de *Vitis vinifera* ca ingredient activ ca atare sau în combinație cu alte extracte naturale, poate induce probleme legate de selectarea unui vehicul acceptabil din punct de vedere cosmetic pentru a acționa ca diluant, dispersant sau purtător pentru ingredientele active, astfel încât să faciliteze distribuția și absorbția acestora atunci când compoziția este aplicată pe piele (brevet WO 2010/056675 A2, brevet WO 2011/055222 A2).
- Nu se menționează realizarea unor studii/teste clinice în fază preliminară a compozиțiilor cosmetice ce includ extracte de *Vitis vinifera* ca atare (din pielișă/sâmburi sau combinații ale acestora) sau în combinație cu alte extracte naturale (brevet ES2228284B1, brevet WO 2010/056675 A2, brevet WO 2011/055222 A2, brevet RO121004B1).
- Utilizarea unor compuși chimici de sinteză (ex. trietanolamină, esterii metilic/propilic ai acidului *p*-hidroxibenzoic) în prepararea compozиțiilor cosmetice (deși nu există suficiente date științifice relativ la comportarea fiecărui astfel de ingredient) poate induce potențiale riscuri legate de formarea unor contaminanți chimici (ex. N-nitrozo compuși (NOC)) [Fiume, M.M., și colab., Int. J. Toxicol., 2015; Elder, R.E. (ed), J. Am. Coll. Toxicol., 1983; Fiume, M.M., și colab., Int. J. Toxicol., 2017] (brevet RO127720B1).

Problema tehnică pe care o rezolvă inventia constă în obținerea unei creme emoliente de uz cosmetic și/sau dermatologic care să poată fi folosită ca produs conținând compuși bioactivi naturali, cu proprietăți hidratante, antirid, antifungică și antibacteriană.

Compoziția conform inventiei, elimină dezavantajele menționate prin aceea că se utilizează o cremă emolientă pentru aplicare pe ten uscat, cu spectru larg, cu formula de bază: lanolină, alcool cetilic, lauril sulfat de sodiu și extract hidroalcoolic din pielișă/sâmbure de struguri (cultură ecologică de *Vitis vinifera* L., soiul Fetească Neagră), care se caracterizează printr-un conținut de extract de 7% (volum/masă).

Extractele hidroalcoolice din pieliță/sâmbure se caracterizează prin aceea că se obțin prin macerare la temperatura camerei, într-un procent de 4% masă uscată/volum. Extractul hidroalcoolic din pieliță se caracterizează prin aceea că are un conținut total de polifenoli în domeniul 2,50-3,50 mg-EAG/mL, un conținut total de flavonoide în domeniul 3,00-4,50 mg-EQt/mL (EQt = echivalent quercetină), o activitate antioxidantă în domeniul 0,80–1,50 mg- EAA/mL (EEA = echivalent acid ascorbic), o acțiune inhibitoare antimicrobiană moderată, *in vitro*, asupra bacteriilor Gram pozitive selectate, cu valori corespondente ale concentrației minime inhibitorii în domeniul 820-4300 µg/mL, o eficiență antifungică scăzută față de tulpinile selectate. Extractul hidroalcoolic din sâmburi de struguri se caracterizează prin aceea că are un conținut total de polifenoli în domeniul 4,50–7,50 mg-EAG/mL, un conținut total de flavonoide în domeniul 4,20-7,70 mg-EQt/mL, o activitate antioxidantă în domeniul 10,00–12,50 mg-EAA /mL, un spectru larg de acțiune, *in vitro*, asupra bacteriilor Gram pozitive selectate, cu valori corespondente ale concentrației minime inhibitorii în domeniul 850-4000 µg/mL, o eficiență antifungică selectivă și moderată față de tulpinile selectate.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- Se utilizează drept sursă de ingrediente bioactive material vegetal provenit din cultură ecologică; astfel se elimină surse potențial toxice adsorbite de plantă, atât pe cale aeriană (stropiri convenționale cu pesticide sau alți agenți chimici de tratament fitosanitar), cât și pe cale radiculară din soluri cu potențială toxicitate istorică sau fertilizate cu diverși produși chimici de sinteză. Lipsa pesticidelor remanente în porțiunile anatomiche ale plantelor utilizate ca sursă de materii prime, este un deziderat al domeniului farmaceutic și cosmetic, în special datorită utilizărilor terapeutice ale fitocompușilor. Cultura ecologică constituie soluția pentru rezolvarea aspectelor legate de satisfacerea cererii pentru produsele naturale, ce nu presupun folosirea compușilor chimici de sinteză.
- Procedeul de obținere al produsului este facil și are costuri minime (macerare la temperatura camerei), bine definit tehnic (procent fix de ingredient activ în crema bază) și nu implică generarea de produse secundare/intermediare potențial toxice, iar tehnologiile de extracție a componentelor/principiilor active cosmetice presupun

consumuri energetice minime conform principiilor tehnologiilor "prietenioase cu mediul". Sunt create astfel premisele unei tehnologii de produse ușor de aplicat.

- Se utilizează ingrediente bioactive ale căror proprietăți fitochimice, antibacteriene și antifungice au fost demonstate prin investigații analitice complexe; astfel, se consideră drept avantaje: (a) utilizarea amestecului etanol-apă, ca solvent de extractie cu eficiență ridicată a compușilor bioactivi cu proprietăți benefice pentru tipuri de ten uscat; (b) definirea clară a domeniilor de CTP (conținut total de polifenoli), CTF (conținut total de flavonoide) și respectiv de AA globală (activitate antioxidantă); comparativ cu alte soluții tehnice existente menționate în prezența cerere de brevet, CTP obținut pentru extractele de pieliță/sâmbure este semnificativ mai mare (pentru CTF și AA nu există date comparative pentru extracte similare din soiul authoton Fetească Neagră); (c) date referitoare la activitatea antibacteriană și antifungică a extractelor pieliță/sâmbure din soiul Fetească Neagră, nu sunt precizate/disponibile date relativ la aceste aspecte.
- Crema bază utilizată pentru înglobarea ingredientelor bioactive (extracte de pieliță/sâmbure) este preparată conform Farmacopeei Române, ediția a X-a, și conține drept vehicul principal lanolina (materia grasă extrasă și purificată din lâna de oaie), recunoscută pentru structura și compoziția care "mimează" matricea lipidică a stratului cornos. Se crează astfel premisele unei utilizări pentru un spectru larg de tipuri de ten uscat.
- Compatibilitatea produselor propuse spre brevetare cu tenul uscat a fost demonstrată prin studii clinice pe subiecți umani conform *Regulamentului (CE no. 1223/2009 privind produsele cosmetice*; rezultatele obținute au fost bune, nu s-au evidențiat reacții adverse de tip iritativ sau inflamatorii la subiecții testați.

Într-un exemplu concret de realizare a invenției se parcurg etapele:

Etapa 1 – se obține extractul din pieliță, respectiv din sâmbure de strugure din soiul Fetească Neagră, cultivat ecologic. Pielita/sâmburii (provenind din fructe proaspete sau din biomasa proaspătă rezultată din diverse procese de prelucrare) au fost separate manual, apoi uscate în etuvă cu ventilație la temperatura de 40°C timp de 48 h. Probele astfel pregătite au fost depozitate la temperatura camerei, în recipiente închise, ferite de

umiditate și lumină. Metoda aleasă pentru extractie a fost macerarea la temperatura camerei (22-23°C, timp de 24 ore, prin contactare cu un solvent constând dintr-o soluție hidroalcoolică 50% (v/v). Proportia solid–lichid (pieliță/sâmbure uscate – solvent hidroalcoolic) utilizată la extractie a fost de 4% masă/volum. Operația s-a desfășurat în recipient închis, primele 3 ore s-a aplicat agitare magnetică, iar în următoarele 21 ore s-a menținut contactul cu solventul utilizat pentru macerare. După 24 ore, amestecul a fost separat prin filtrare, iar filtratul (extractul de pielită/sâmbure) a fost menținut la rece (4-5°C) pentru analize bio-fizico-chimice, respectiv până la momentul înglobării în crema-bază (etapa 3).

Etapa 2 – se prepară crema-bază pentru ten uscat, în conformitate cu *Farmacopeea Română* ediția a X-a [Farmacopea Română, ed. a X-a, 2015] cu următoarea compoziție: 15,00 g alcool cetilic, 20,00 g lanolina, 1,00 g lauril sulfat de sodiu, q.as.ad 100,00 apă distilată. Alcoolul cetilic, lanolina și lauril sulfatul de sodiu se topesc pe baia de apă la 50°C. După topire, se adaugă treptat și sub agitare continuă, apă distilată, la aceeași temperatură de 50°C. Se omogenizează/mixează continuu până la răcire.

Etapa 3 – înglobarea extractului s-a realizat prin amestecare lentă a extractului lichid de pielită/sâmbure din soiul Fetească Neagră în crema-bază preparată conform etapei 2. S-a utilizat o proporție de 7 mL extract/100 g cremă-bază.

Extractele obținute în etapa 1 și cremele care fac obiectul invenției au fost caracterizate prin procedee bio-fizico-chimice de analiză. Astfel, pentru extractele hidroalcoolice din pielită/sâmbure de struguri, soiul Fetească Neagră, au fost determinate experimental: pH-ul și conductivitatea electrică, conținutul total de compuși polifenolici, conținutul total de flavonoide, activitatea antioxidantă, activitatea antimicrobiană și a fost realizat un profil chromatografic al compușilor cu potențial bioactiv. Au fost realizate teste comparative între extractele utilizate, crema-bază și cremele care fac obiectul invenției prin spectroscopie vibrațională în IR și Raman; prin aceste investigații experimentale s-a urmărit identificarea unor modificări de structură, dar și evidențierea înglobării unor compuși cu potențial bioactiv din extracte, în crema-extract pielită/sâmbure propusă spre brevetare (Figura 1 și Figura 2). Determinarea Resveratrolului (*cis*, *trans*) și a Piceidului (*cis*, *trans*) prin Cromatografia de Lichide de

Înaltă Performanță (HPLC) în extractele hidroalcoolice din pieliță/sâmburi de *Vitis vinifera* L., soi românesc Fetească Neagră, s-a realizat utilizând metoda descrisă de Rosa M. Lamuela-Raventos și colab., în articolul *Direct HPLC Analysis of cis- and trans-Resveratrol and Piceid Isomers in Spanish Red Vitis vinifera Wines* [Rosa M. Lamuela-Raventos și colab., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(2), 281-283]. Standardul față de care s-au raportat valorile a fost etalon de *cis*-, *trans*-resveratrol.

Determinările de pH și conductivitate electrică a extractelor utilizate pentru prepararea cremelor care fac obiectul inventiei au arătat valori în intervalul 4,4 – 4,7 pentru pH (extract pieliță) și 5,4 – 5,7 pentru pH (sâmbure), respectiv în intervalul 290 – 310 µS/cm (extract pieliță) și 155 – 175 µS/cm (sâmbure) pentru conductivitatea electrică.

Determinarea conținutului total de polifenoli s-a realizat prin spectrometrie de absorbție în ultraviolet-vizibil, metoda Folin-Ciocâlteu, conform descrierii incluse în *Phytochemical Profiles, Antioxidant and Antibacterial Activities of Grape (Vitis vinifera L.) Seeds and Skin from Organic and Conventional Vineyards* [Radulescu, C. și colab., PLANTS-Basel, 2223-7747, 2020, 9, 11, 1470], care are la bază un proces chimic de oxidare a polifenolilor în prezența reactivului Folin-Ciocâlteau. Citirile s-au efectuat la lungimea de undă 765 nm, în cuve cu lungimea drumului optic de 10 mm, iar conținutul total de polifenoli s-a determinat folosit o curbă de calibrare în acid galic ca antioxidant de referință, valorile fiind exprimate în miligrame echivalent acid galic per mL extract (mg-EAG/mL).

Determinarea conținutului total de flavonoide s-a realizat conform procedurii descrise în *Influence of Extraction Method on Chemical Composition from Red Grapes Skin Extract* [Nicolescu, C.M., și colab., Journal of Science and Arts, 1844-9581, 2019, 1, 201, 208], metoda aplicată fiind spectrofotometrică bazată pe formarea unor combinații complexe din reacția ionului Al³⁺ cu grupările carbonil și hidroxil din structura flavonoidelor. Citirile s-au efectuat la lungimea de undă 510 nm, în cuve cu lungimea drumului optic de 10 mm, iar valorile conținutului total de flavonoide s-au determinat cu

ajutorul unei curbe de calibrare ce folosește quercetina ca flavonoid de referință, valorile sunt exprimate în miligrame echivalent quercetină per mililitru extract (mg-EQt/mL).

Activitatea antioxidantă a fost determinată prin metoda Prieto, conform descrierii prezentate în *Phytochemical Profiles, Antioxidant and Antibacterial Activities of Grape (*Vitis vinifera L.*) Seeds and Skin from Organic and Conventional Vineyards*, [Radulescu, C. și colab., PLANTS-Basel, 2223-7747, 2020, 9, 11, 1470], care are la bază formarea unui complex fosfomolibdenic de culoare, citirile realizându-se la lungimea de undă 700 nm, în cuve cu lungimea drumului optic de 10 mm. Curba de calibrarea a fost trasată folosind ca referință acidul ascorbic, iar valorile activității antioxidante s-au exprimat în echivalent acid ascorbic per mL extract (mg-EAA/mL).

Studiul activității antimicrobiene. Materialul biologic: Extractele din pielea și sămburii strugurilor au fost obținute cu asigurarea condițiilor de sterilitate pentru materialele utilizate și pentru mediul de lucru în ansamblul său. Un număr de șase tulpieni de bacterii, respectiv trei tulpieni de fungi din Colecția de Culturi a Institutului de Cercetări Multidisciplinare pentru Știință și Tehnologie - Universitatea "Valahia" din Târgoviște au fost testate cu privire la inhibarea creșterii în prezența compușilor antimicrobieni existenți în extractele hidroalcoolice obținute din struguri. Tulpinile au fost alese astfel încât să provină din diferite habitate (produse alimentare, sol, aer – podgoria de proveniență a strugurilor) și să aparțină unui număr divers de genuri. Se cunoaște faptul că multe tulpieni de *Bacillus* se utilizează pe scară largă în biotecnologie, fiind considerate GRAS (Generally Recognized As Safe) de către Food and Drug Administration (FDA). De asemenea, numeroase tulpieni de *Bacillus* prezintă trăsături benefice de promovare și protecție a creșterii plantelor și au un potențial mare de a fi utilizate ca agro-inoculanți, deoarece sunt formatori de spori și ușor de formulat și conservat [Sicuia, O.A., și colab., Acta Hortic., 2017, 1164, 257]. Numeroase specii de bacterii lactice (LAB), bacterii cu multiple aplicații în industria alimentară, fac parte din microbiota intestinală a oamenilor și animalelor [Vaughan, E.E., și colab., FEMS Microbiology Review, 2005, 29, 477], aspect care a stat, de asemenea, la baza selectării tulpinilor de bacterii mai sus menționate, în contextul temei propunerii de brevet. Tulpinile de mucegaiuri propuse în studiu aparțin unor genuri potențial

producătoare de micotoxine pielii [Dantigny, P., și colab., CRC Press, Taylor & Francis Group, 2021] și potențial prezente în microbiota pielii [Hammoudi, N., și colab., Sci Rep, 2021, 11, 3777]. Tulpinile bacteriene au fost izolate și caracterizate prin tehnici microbiologice clasice. Izolarea culturilor pure de bacterii a fost efectuată din diferite habitate (alimente de origine animală și alimente de origine vegetală, aer), după repicări succesive, astfel încât să se evite contaminarea microorganismelor utilizate ca test. Pentru creșterea bacteriilor s-a folosit bulion de carne agarizat ($\text{pH} = 6,8 \pm 0,2$), iar incubarea s-a efectuat la $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Caracterizarea macroscopică și microscopică a coloniilor a fost făcută în conformitate cu Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Culturile pure izolate au fost menținute pe bulion nutritiv agarizat, la 4°C . Izolarea tulpinilor de fungi din medii naturale a fost realizată prin inocularea (1 mL) din diluții seriale (10^{-3} - 10^{-6}) în plăci Petri cu mediu Cartof - Dextroză - Agar (PDA). Plăcile au fost incubate la 28°C timp de o săptămână, apoi coloniile fungice s-au izolat sub formă de culturi pure. Identificarea genului fungilor a fost efectuată prin examinări macroscopice și microscopicice, în funcție de culoarea coloniei, forma acesteia, prezența hifelor, conidii, conidiofori și disponerea sporilor.

Determinarea activității antimicrobiene a extractelor de struguri.

Determinarea activității antimicrobiene a extractelor hidroalcoolice din struguri (pielită, sămburi) a fost efectuată în medii nutritive solide, prin aplicarea metodei difuzimetrice (Kirby-Bauer), care a permis determinarea concomitentă a spectrului de sensibilitate a microorganismelor (tulpini de bacterii și respectiv mucegaiuri), cât și a valorii concentrației minime de inhibiție (CMI). S-au folosit două metode de evidențiere a activității antimicrobiene: tehnica discurilor impregnate cu extracte (tehnica difuzimetrică cu discuri), standardizată, metodă recomandată de NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standardisation) și tehnica difuzimetrică cu godeuri. Pentru tulpinile de bacterii izolate, un volum de cultură proaspătă (20-50 μL - în funcție de diametrul plăcii Petri), cu densitatea optică la 600 nm (DO_{600}) cuprinsă între 0,2 și 0,4, a fost dispersată în plăci cu mediu Bulion de carne cu agar. După zvântarea plăcilor în vecinătatea unui bec de gaz (timp de 10–15 min), pe suprafața acestora au fost așezate discurile impregnate timp de 1h în extractele din pieleită/sămburi, pregătite anterior

conform protocolului descris. Discurile au fost așezate la aproximativ 15 mm de periferia plăcii și respectiv la 30 mm unul de celălalt. Plăcile au fost incubate la 37°C timp de 48h. Extractele cu acțiune antibacteriană au prezentat o zonă clară (halou) în jurul coloniei, ca urmare a inhibării creșterii tulpinii de bacterii testate. S-au efectuat măsurători ale zonei de inhibare a creșterii. Pentru determinarea activității antifungice a extractelor din struguri, pe suprafața plăcilor Petri cu mediu nutritiv (must de malț) agarizat însămânțat "în pânză" cu un inocul standardizat din fiecare tulpină de mucegai testată, s-au staționat godeuri (5 mm diametru) la aproximativ 15 mm de periferia plăcii și respectiv la 30 mm unul de celălalt. În fiecare godeu, fără a se depăși marginile, au fost repartizate extractele din struguri (10 µL), ca atare (câte 2 extracte a 2 probe fiecare pe o placă). Plăcile au fost incubate la temperatura de 25°C timp de 3 zile. Citirea a constat, ca și în cazul determinării activității antibacteriene, în aprecierea mărimii zonelor de inhibiție induse de extracte, zone în care coloniile microbiene au lipsit. Toate determinările au fost efectuate în triplicat. Rezultatele s-au exprimat sub forma valorilor medii obținute prin efectuarea mediei aritmetice a diametrelor corespunzătoare celor 3 testări. Valoarea concentrației minime de inhibiție a extractelor obținute din struguri s-a determinat prin metoda diluțiilor în mediu lichid. Un inocul standardizat al tulpinii testate a fost însămânțat într-un gradient discontinuu de concentrații ale extractului (pieliță/sâmburi), în tuburi cu bulion nutritiv. După incubarea adecvată, la temperatura de $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ timp de 48h, s-au citit valorile CMI prin observarea macroscopică a tuburilor. Concentrația de extract corespunzătoare tubului cu cea mai mică concentrație, care a inhibat creșterea vizibilă a culturii microbiene, a reprezentat valoarea CMI ($\mu\text{g/mL}$) pentru extractul respectiv. Pentru prepararea inoculului standardizat s-au utilizat tulpini microbiene în vîrstă de 18-24 ore, prelevând colonii identice care au fost susținute în soluție salină sterilă - inocul reprezentativ; mărimea inoculului a fost standardizată pe bază spectrofotometrică, prin intermediul densității optice la lungimea de undă de 600 nm, $\text{DO}_{600} = 0,2-0,4$).

Pentru cremele obținute au fost realizate studii clinice *in vivo*, rezultatele studiului fiind inserate în Raportul privind siguranța produsului cosmetic, conform Anexei I a Regulamentului (CE) no. 1223/2009 privind produsele cosmetice. În acest sens, au fost

emise Buletine de analiză (nr. 209928/27.11.2020, 209929/27.11.2020) și Rapoarte privind siguranța produsului cosmetic, pentru: punctul 1 (Compoziția cantitativă și calitativă a produsului cosmetic), punctul 5 (Utilizare normală și rațional previzibilă), punctul 6 (Expunerea la produsul cosmetic), punctul 7 (Expunerea la substanțe), punctul 8 (Profilul toxicologic al substanțelor) și punctul 10 (Informații cu provire la produsul cosmetic), către producătorul Hyperici Farm SRL, de către laboratorul/persoană acreditată. Astfel, au fost efectuate un teste pentru verificarea compatibilității produselor cosmetice CREMĂ EMOLIENTĂ PENTRU TEN USCAT CU EXTRACT DE PIELITĂ/SÂMBURE (CULTURĂ ECOLOGICĂ VITIS VINIFERA L., SOIUL FETEASCĂ NEAGRĂ) prin aplicare dermală unică în condiții ocluzive (patch-test) în condiții experimentale exagerate, la subiecți umani cu vârstă cuprinsă între 15 și 65 de ani, pe bază de accept consimțit și voluntariat (cu respectarea legislației care guvernează derularea studiilor clinice, a Regulilor de Bună Practică în Studiul Clinic și acordul Comisiei Naționale de Etică). Studiul a avut drept scop să verifice acceptabilitatea pielii și să evalueze calitățile cosmetice ale cremei emoliente pentru ten uscat propusă pentru brevetare, după aplicare timp de 10 zile. Rezultatele studiului au fost bune și au evidențiat faptul că nu au existat reacții adverse de tip iritativ sau inflamatorii la subiecții testați. Raportul din data de 19.11.2020, a fost însoțit de un protocol, studiu și rezultate asumate de către laboratorul acreditat. Rapoartele au fost eliberate pentru a servi organelor de control abilitate pentru a supraveghea plasarea pe piață a acestor creme emoliente cu extract de sâmbure/pielită din cultură ecologică de Fetească Neagră. De asemenea, se precizează conform art 13 din Regulamentul (CE) no. 1223/2009 al Parlamentului European privind produsele cosmetice, că produsul trebuie notificat prin Portalul pentru Notificarea Produselor Cosmetice (CPNP).

Evaluarea modificărilor de structură prin spectroscopie vibratională

Analiza probelor investigate (extract, bază cremă și crema ce înglobează extractul) a fost realizată cu o manipulare cât mai redusă posibil pentru evitarea contaminării acestora, reactivii chimici utilizați pentru fixare, legare sau eluție putând duce la relocarea elementelor în urme și schimbarea compoziției chimice native și structurale a probelor [Turker-Kaya, S., și colab., Molecules, 2017, 22, 168]. Principala

barieră în calea administrării principiilor medicamentoase dermice este constituită de stratul cornos (*stratum corneum*) care formează stratul exterior al epidermei. Stratul cornos (SC) este format din mai multe straturi de corneocite parțial suprapuse care sunt încunjurate de învelișul celulei și sunt încorporate într-o matrice lipidică [Carrer, V., și colab., Pharmaceutics, 2018, 10, 73]. Permeabilitatea SC depinde de interacțiunea dintre piele, produsul/principiul medicamentos și componentele vehiculului. Datorită gradului ridicat de impermeabilitate al învelișului cornificat al corneocitelor, matricea lipidică SC constituie bariera reală în cazul difuziei substanței prin piele [Carrer, V., și colab., Pharmaceutics, 2018, 10, 73]. Structura lanolinei "mimează" matricea lipidică a SC având compoziție și proprietăți similare (colesterol și derivați ai acestuia, ceramide, acizi grași liberi).

În afara de influența asociată factorilor de mediu, curățarea zilnică cu săpun sau agenții tensioactivi poate duce la afectarea barierei pielii. Agenții tensioactivi nu doar înlătură/spală impuritățile și excesul de sebum, ci pot elimina și o parte din amestecul intercelular de lipide [Prasch, T., și colab., J. Cosmet. Sci., 2000, 22, 371]. Chiar și atunci când cantitatea de lipide îndepărțată este redusă, îndepărțarea selectivă a acizilor grași liberi și a esterilor de colesterol poate duce la o modificare semnificativă a compoziției lipidelor intercelulare. În plus, agenții tensioactivi pătrund în stratul cornos, se adsorb pe keratina corneocitelor și se amestecă cu lipidele intercelulare având ca rezultat o afectare a barierei cutanate [Prasch, T., și colab., J. Cosmet. Sci., 2000, 22, 371]. În domeniul cosmetic se fac eforturi pentru a evita aceste efecte nedorite. În cazul pielii care are proprietăți de barieră deteriorate, amestecurile de lipide fiziologice pătrund lent în epidermă și reconstruiesc bariera într-un mod natural prin metabolizarea accelerată în corpurile lamelare și joacă un rol în recuperarea pielii scuamoase în urma acțiunii agenților tensioactivi [Prasch, T., și colab., J. Cosmet. Sci., 2000, 22, 371].

Extractele polifenolice sunt caracterizate prin prezența numeroaselor structuri aromatic hidroxilice ce le conferă capacitatea de a forma complecși cu proteinele. Taninurile hidrolizabile alături de structurile menționate anterior conțin și grupe carbonil, în special sub formă de esteri, putând fi hidrolizați la acizi în sistemele apoase [dos Santos, G.F., și colab., Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc., 2016, 153, 94].

Benzile spectrale în domeniul 3500-3100 cm⁻¹ (bandă intensă în spectrul extractului de pieleță centrată la ~3294 cm⁻¹ și respectiv la ~3279 cm⁻¹ în spectrul cremei cu extract de pieleță) pot fi atribuite vibrațiilor de întindere cumulate ale grupelor -OH, aspect caracteristic extractelor polifenolice [Fernandez, K., și colab., J. Agric. Food Chem., 2007, 55, 7294; Unsalan, O., și colab., J. Raman Spectrosc., 2009, 40, 562; dos Santos, G.F., și colab., Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc., 2016, 153, 94; Smith, B.C., Infrared Spectral Interpretation: A Systematic Approach, 1999]. De regulă în acest domeniu spectral extractele polifenolice prezintă benzi vibraționale similare acizilor; cu toate acestea se înregistrează de fapt suma contribuțiilor vibraționale ale grupărilor -OH. Banda spectrală localizată la ~2978 cm⁻¹ (maxim de intensitate medie prezent în spectrul extractului de pieleță) poate fi asociată solventului (etanol) fiind datorată vibrațiilor de întindere ale grupărilor O-H [dos Santos, G.F., și colab., Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc., 2016, 153, 94]. Maximele spectrale distințe de la 2916 și 2849 cm⁻¹ pot fi atribuite conformatiei catenei alchilice lipidice (lanolină) fiind asociate vibrațiilor de întindere CH₂ asimetrice și respectiv simetrice [Carrer și colab., Pharmaceutics, 2018, 73]; ambele maxime pot fi clar observate în spectrul bazei-cremă și cel al cremei cu extract de pieleță. Deplasarea poziției maximului de la 2849 cm⁻¹ către numere de undă mai mari indică, în general, o creștere al gradului de dezordine al catenei (de la conformatie ortorombică, hexagonală la cea de lichid cristalin); o comportare similară o poate avea și maximul de la 2916 cm⁻¹ deși vibrațiile de întindere simetrice sunt mai sensitive la modificările conformationale [Carrer și colab., Pharmaceutics, 2018, 73]. Maximul spectral localizat la ~1736 cm⁻¹ poate fi asociat vibrațiilor de întindere carbonilice (C=O) [Westfall, A., și colab., Antioxidants, 2020, 9, 486; Pasieczna-Patkowska, S. și Olejnik, T., Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska, AA-Chemia, 2013, 68, 95] fiind prezent atât în spectrul bazei-cremă (intensitate redusă), cât și al cremei cu extract de pieleță (intensitate medie).

Maximul spectral de intensitate medie localizat la 1641 cm⁻¹ poate fi asociat vibrațiilor de întindere C=C aromatică prezente în taninurile condensate [dos Santos, G.F., și colab., Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc., 2016, 153, 94] precum și vibrațiilor de întindere C=O și prezenței legăturilor nesaturate din structurile flavonoidice

[Turker-Kaya, S., și colab., Molecules, 2017, 22, 168, Smith, B.C., Infrared Spectral Interpretation: A Systematic Approach, 1999; Noh, C., și colab., Adv. Sci. Technol. Eng. Syst. J., 2017, 2, 435]; prezența acestui maxim sugerează prezența atât flavonelor cât și a flavanonelor [Noh, C., și colab., Adv. Sci. Technol. Eng. Syst. J., 2017, 2, 435]. Benzile de intensitate redusă de la 1448, 1390 și 1375 cm⁻¹ pot fi asociate vibrațiilor de îndoire C-H ale grupelor CH₂ și CH₃ (polizaharide asociate pereților celułari, lipide și proteine) [Turker-Kaya, S., și colab., Molecules, 2017, 22, 168], vibrațiilor de întindere C=C-C asociate nucleului aromatic [Agatonovic-Kustrin, S., și colab., Mod. Chem. Appl., 2013, 1, 110], vibrațiilor de îndoire asociate ciclurilor aromatic (flavonoide) [Oliveira, R.N., și colab., Materia (Rio J.), 2016, 21, 769] și vibrațiilor de deformare O-H în plan din compușii polifenolici [Agatonovic-Kustrin, S., și colab., Mod. Chem. Appl., 2013, 1, 110]. În domeniul spectral 900-1160 cm⁻¹ (maxime de intensitate crescută, distințe îndeosebi în spectrul extractului de pieleță – 1043 și 1084 cm⁻¹ – dar și al spectrului bazei-cremă și cremei cu extract la ~1060 cm⁻¹) maximele spectrale pot fi asociate vibrațiilor de întindere C-O ale fragmentelor glicozidice și într-o măsură mai redusă vibrațiilor de întindere aromatic C-O [Westfall, A., și colab., Antioxidants, 2020, 9, 486]. Domeniul spectral 1150-1400 cm⁻¹ prezintă benzi multiple de intensitate variabilă atribuite vibrațiilor de întindere C-O și vibrațiilor de îndoire C-O-H asociate fenolilor, esterilor, acizilor carboxilici și alcoolilor [Westfall, A., și colab., Antioxidants, 2020, 9, 486; Coates, J., Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach, 2000, 10815]; maxime de intensitate variabilă prezente îndeosebi în spectrul extractului de pieleță și al cremei cu extract de pieleță. Maximul spectral localizat la 1085 cm⁻¹ poate fi atribuit vibrațiilor de deformare C-H aromatic în plan [Fernandez, K., și colab., J. Agric. Food Chem., 2007, 55, 7294; Ping, L., și colab., Ind Crops Prod., 2012, 40, 13; Jensen, J.S., și colab., J. Agric. Food Chem., 2008, 56, 3493] și vibrațiilor de deformare C-O (alcoolii secundari, esteri alifatici) [Turker-Kaya, S., și colab., Molecules, 2017, 22, 168; Agatonovic-Kustrin, S., și colab., Mod. Chem. Appl., 2013, 1, 110]. Vibrațiile de întindere O-H și C-OH (polizaharide componente ale pereților celułari) pot fi asociate maximului prezent la 1044 cm⁻¹ [Agatonovic-Kustrin, S., și colab., Mod. Chem. Appl., 2013, 1, 110]. Maximul spectral de intensitate medie de la 877 cm⁻¹ poate fi asociat

vibrațiilor de îndoire C-H aromatice în afara planului [dos Santos, G.F., și colab., Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc., 2016, 153, 94] și vibrațiilor de întindere C-O (monozaharide) [Turker-Kaya, S., și colab., Molecules, 2017, 22, 168] și C-C [Oliveira, R.N., și colab., Materia (Rio J.), 2016, 21, 769]. Spectrele cremei-bază și ale cremei cu extract de pieliță prezintă de asemenea maxime spectrale asociate alcolului cetilic localizate la ~1640, 1464 (vibrații de îndoire CH₂ asociate catenei alifatice), 1060 (vibrații de întindere C-O) și 719 cm⁻¹ (vibrații de întindere O-H ale grupărilor alcoolice) [Argimon, M., și colab., J. Braz. Chem. Soc., 2016; Elmowafy, M., și colab., J. Drug Deliv. Sci. Technol., 2018, 45, 230; Pasieczna-Patkowska și S., Oleinik, T., Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska, AA-Chemia, 2013, 68, 95].

Spectrul FTIR al extractului de sămburi furnizează o serie de informații spectrale îndeosebi în domeniile spectrale 3350-2900 cm⁻¹ și 1650-850 cm⁻¹. Banda spectrală largă, intensă, centrată la ~3330 cm⁻¹ poate fi atribuită componentelor solventului de extracție și grupelor hidroxilice din structura compușilor fenolici (vibrații de întindere ale grupelor hidroxil). Maximele prezente la 2978 și 2901 cm⁻¹ pot fi asociate vibrațiilor de întindere C-H asimetrice asociate grupelor metil și respectiv metin [daRocha, J.C., și colab., Int. J. Electrochem. Sci., 2012, 7, 11941; Brezoiu și colab., 2019, Coates, J., Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach, 2000, 10815]. Banda spectrală de la 1643 cm⁻¹ este asociată caracterului aromatic, vibrațiilor de întindere C-H [Heredia-Guererro, J.A., și colab., FPLS, Plant Biophysics and Modelling, 2014, 5, 305; Lucarini, M., și colab., Foods, 2020, 9, 10] și vibrațiilor de întindere C=O conjugate [daRocha, J.C., și colab., Int. J. Electrochem. Sci., 2012, 7, 11941]. Regiunea amprentă 1500-800 cm⁻¹ prezintă numeroase maxime de intensitate variabilă asociate diferitelor moduri de vibrație. Deși este un domeniu spectral bogat în informații este dificil de analizat datorită complexității; în acest domeniu spectral maximele prezente pot fi asociate alcoolilor, zaharurilor, acizilor organici, compușilor fenolici [Lucarini, M., și colab., Foods, 2020, 9, 10]. În regiunea 1390-1310 cm⁻¹ (maxime definite prezente la 1373 și 1315 cm⁻¹) benzile spectrale pot fi asociate vibrațiilor de deformare angulare C-O-H din fenoli [daRocha, J.C., și colab., Int. J. Electrochem. Sci., 2012, 7, 11941], vibrațiilor de îndoire metilenice în afara planului (polizaharide, pectine) [Nogales-Bueno,

J., și colab., Food Chem., 2017, 232, 602], vibrațiilor de forfecare metilen și C-O [Lucarini, M., și colab., Foods, 2020, 9, 10; Nogales-Bueno, J., și colab., Food Chem., 2017, 232, 602] precum și vibrațiilor de întindere ale inelului piranic (carbohidrați) [Tociu, M., și colab., UPB Scientific Bulletin B, 2019, 81]. Maximul de la $\sim 1161\text{ cm}^{-1}$ este asociat vibrațiilor de întindere C-O esterice [Mohansrinivasan, V., și colab., Braz. Arch. Biol. Technol., 2015, 58, 540; Canbay, H.S., și colab., SDU J. Science (E-Journal), 2011, 6, 140; Tociu, M., și colab., UPB Scientific Bulletin B, 2019, 81] și C-H aromatice [Nogales-Bueno, J., și colab., Food Chem., 2017, 232, 602] atribuite compușilor fenolici. Benzile spectrale de intensitate mare și respectiv medie de la 1043 și 877 cm^{-1} pot fi asociate vibrațiilor de deformare C-H asociate nucleului armomatic [daRocha, J.C., și colab., Int. J. Electrochem. Sci., 2012, 7, 11941] și respectiv vibrațiilor de îndoire C-H aromatice [dos Santos, G.F., și colab., Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc., 2016, 153, 94].

Spectrele FTIR ale cremei-bază (CB) și cremei cu extract de sămburi (CES) prezintă multiple caracteristici spectrale similare ce sugrează o înglobare avansată a extractului în CB; proporția redusă (7%) a extractului în formulare determină totodată suprapunerea/combinarea maximelor intense asociate componentilor CB (lanolină, alcool cetilic, lauril sulfat de sodiu) cu maximele spectrale asociate extractului [Westfall, A., și colab., Antioxidants, 2020, 9, 486; Coates, J., Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach, 2000, 10815]. Banda spectrală intensă, centrată la $\sim 3340\text{ cm}^{-1}$ prezintă atât în spectrul CB cât și în cel al CES poate fi atribuită vibrațiilor de întindere OH asociate solventului de extractie, alcoolului cetilic și grupelor OH asociate compușilor din extract, iar maximele intense de la 2915 și 2828 cm^{-1} pot fi asociate vibrațiilor de întindere metilen asimetrice și respectiv simetrice [Coates, J., Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach, 2000, 10815], atribuite în principal lanolinei, dar și lauril sulfatului de sodiu [SpectraBase, John Wiley & Sons Inc., Lanolin, 2021; SpectraBase, John Wiley & Sons Inc., Sodium Lauryl sulfate, 2021]. În domeniul spectral 1800-1300 cm^{-1} spectrele CB și CES prezintă o serie de maxime spectrale de intensitate variabilă, atribuite în special vehiculului (CB), dar și extractului de sămburi, prezente la: 1736 cm^{-1} (vibrații de întindere asociate grupelor carbonil – aldehidă, ester

– atribuite compușilor din extract și lanolinei) [SpectraBase, John Wiley & Sons Inc., Lanolin, 2021], ~1638 cm⁻¹ (vibrări de întindere C=C asociate compușilor fenolici și influenței caracterului aromatic al acestora) [Heredia-Guererro, J.A., și colab., FPLS. Plant Biophysics and Modeling, 2014, 5, 305; Coates, J., Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach, 2000, 10815], 1464 cm⁻¹ (vibrări de îndoire metil asimetrice asociate scheletului alchilic – alcool cetilic, lanolină – conjugate cu vibrări de întindere ale inelului aromatic – compuși fenolici din extract) [SpectraBase, John Wiley & Sons Inc., Lanolin, 2021; SpectraBase, John Wiley & Sons Inc., Cetyl alcohol, 2021; Coates, J., Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach, 2000, 10815], 1375 cm⁻¹ (vibrări de deformare angulare C-O-H din fenoli conjugate cu vibrări de întindere și îndoire dimetil/izometil) [SpectraBase, John Wiley & Sons Inc., Lanolin, 2021; daRocha, J.C., și colab., Int. J. Electrochem. Sci., 2012, 7, 11941, Coates, J., Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach, 2000, 10815]. Maximele spectrale de intensitate redusă de la 1172 și 1060 cm⁻¹ pot fi asociate suprapunerii maximelor datorate extractului (vibrări de întindere C-O esterice și C-H aromatice) și componentelor CB (vibrări de întindere C-C ale catenelor alifatice) [SpectraBase, John Wiley & Sons Inc., Lanolin, 2021; SpectraBase, John Wiley & Sons Inc., Sodium Lauryl sulfate, 2021; SpectraBase, John Wiley & Sons Inc., Cetyl alcohol, 2021].

Prezența resveratrolului (*cis*, *trans*) și a piceidului (*cis*, *trans*) s-a investigat prin HPLC-UV/DAD în extractele hidroalcoolice din pieliță/sâmburi de *Vitis vinifera* L. Cromatogramele au arătat, pentru extractele analizate, la 285 nm, *cis*-resveratrol, iar la 306 nm, *trans*-resveratrol. Valorile cantitative, exprimate ca medie ± deviație standard (n=3), obținute au fost de 3,65±0,42 și 10,14±1,02 µg/g s.u. *cis*-resveratrol pentru extractele de pieliță, respectiv sâmbure de Feteasca Neagră, iar pentru *trans*-resveratrol, valorile au fost, respectiv, de 2,92±0,01 și 1,72±0,49 µg/g s.u. Valorile obținute pentru glucozid stilbenoizii, *trans*-piced, respectiv *cis*-piceid în extractele hidroalcoolice din pieliță/sâmbure sunt: 13,48±1,01 și 29,01±2,71 µg/g s.u. (*trans*-piced), respectiv 3,01±0,55 și 9,40±0,51 µg/g s.u. (*cis*-piced).

Activitatea antibacteriană a extractelor din pieliță și sâmburi. Extractele hidroalcoolice, din pieliță/sâmburi de struguri (*Vitis vinifera* L.), soiul Fetească Neagră

provenit din cultură ecologică, au prezentat acțiune antibacteriană față de tulpinile Gram pozitive testate. Efectul antibacterian diferențiat manifestat de extractul de pieliță/sâmburi relativ la tulpinile bacteriene testate a fost evaluat prin intermediul diametrului de inhibare a creșterii bacteriene și determinarea CMI (Figura 3). Diametrul zonei de inhibare a creșterii s-a situat în limitele 8-16 mm, valorile prezentate (Figura 3) reprezentând media aritmetică a trei determinări, fiind inclus diametrul discului impregnat cu extract (6 mm) aferent metodei de evidențiere a activității antibacteriene (tehnica difuzimetrică cu discuri). Diametrele zonelor de inhibare a creșterii (mm) de către extractul hidroalcoolic din pieliță, în cazul soiului Fetească Neagră cultivat în sistem ecologic, au variat în ordinea: (*Lactococcus sp.*/CCB1, $0\pm0,5$) > (*Lactobacillus sp.*/CCB5, $15\pm0,41$) > (*Bacillus sp.*/CCB3, $10\pm1,41$) = (*Bacillus sp.*/CCB4, $10\pm0,71$) = (*Leuconostoc sp.*/CCB7, $10\pm0,82$) > (*Streptococcus sp.*/CCB6, $9\pm0,82$). Diametrele zonelor de inhibare a creșterii (mm) de către extractul hidroalcoolic din sămburi, în cazul soiului Fetească Neagră cultivat în sistem ecologic, au variat în ordinea: (*Lactococcus sp.*/CCB1, $16\pm0,41$) > (*Streptococcus sp.*/CCB6, $14\pm0,71$) > (*Bacillus sp.*/CCB3, $10\pm0,82$) = (*Leuconostoc sp.*/CCB7, $10\pm0,71$) > (*Bacillus sp.*/CCB4, $8\pm0,82$) = (*Lactobacillus sp.*/CCB5, $8\pm0,71$). Analiza comparativă a datelor evidențiază faptul că extractul hidroalcoolic obținut din sămburi a prezentat o intensitate mai mare a activității antibacteriene (față de tulpinile bacteriene CCB1 și CCB6, pentru care concentrația minimă de inhibiție a înregistrat valori net inferioare comparativ cu valorile corespondente extractului de pieliță, pentru aceleași tulpi testate) și un spectru relativ mai larg (activitate antibacteriană manifestată pentru toate cele șase tulpi bacteriene testate), comparativ cu extractul obținut din pieliță (Figura 3).

Valorile concentrației minime de inhibiție ale extractelor obținute din pieliță strugurilor au variat între 820 și 4300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, evidențierind astfel activitatea antagonistă a extractelor față de creșterea majorității tulpinior bacteriene testate. Valorile CMI ale extractelor obținute din sămburii strugurilor au variat între 850 și 3600 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Substanțele cu activitate antibacteriană (în raport cu tulpinile testate) au fost prezente cu precădere în sămburii strugurilor, valorile mai mari ale activității antibacteriene (cuantificate ca valori ale diametrului de inhibare a creșterii bacteriene, valori ale CMI și

spectru de inhibare a creșterii bacteriene), comparativ cu valorile corespondente înregistrate pentru extractele hidroalcoolice din pieleță fiind corelate cu conținutul total de compuși polifenolici, conținutul total de flavonoide și activitatea antioxidantă, net superioare în cazul extractele hidroalcoolice din sămburi. Standardizarea extractelor hidroalcoolice obținute din pieleță și din sămburii strugurilor și cunoașterea valorilor CMI aferente acestora, prezintă importanță practică deosebită în vederea propunerii de aplicații pentru diferite domenii, aplicații în cadrul cărora activitatea bacteriostatică și bactericidă să fie științific fundamentată în raport cu o anumită tulpină bacteriană.

Potențialul antibacterian și antiinflamator al compușilor naturali, derivați din plante, a fost raportat în multe studii. Astfel, cercetări *in vitro* și *in vivo* au evidențiat faptul că amestecuri de uleiuri esențiale, oleorezină, flavonoide, alcaloizi, compuși fenolici, taninuri, glicozide sunt eficiente în tratamentul acneei datorită activităților lor antimicrobiene și antiinflamatorii [Azimi, H., și colab., Fitoterapia, 2012, 83, 1306; Fisk, W.A. și colab., Phytother. Res. 2014, 28, 1137]. Dovezi emergente indică faptul că uleiurile esențiale derive din plante și / sau compușii lor majori pot reprezenta un tratament alternativ plauzibil pentru acnee, o tulburare prevalentă a pielii atât la adolescenți, cât și la populațiile adulte. În acest context, o combinație antimicrobiană eugenol / β-pinene / 2-fenoxietanol / sorbat de potasiu a fost inclusă în formularea unei baze de cremă antiacneică [Saviuc, C., și colab., Int. J. Mol. Sci., 2017, 18, 175]. Tulpinile bacteriene propuse în cadrul acestui brevet au potențial de utilizare în aplicații farmaceutice, având în vedere faptul că *B. subtilis* este un organism ubicvitar, care se găsește adesea în microbiomul pielii.

Activitatea antifungică a extractelor din pieleță și sămburi. Extractele hidroalcoolice din pieleță și sămburii strugurilor (*Vitis vinifera* L., soi Fetească Neagră) au manifestat activitate antifungică nulă până la moderată față de *Rhizopus spp.*, *Penicillium spp.* și *Aspergillus spp.* testate. Diametrele zonelor de inhibare a creșterii tulpinilor fungice testate au fost mai mici comparativ cu cele pe care le-au manifestat aceleași extracte, față de tulpinile de bacterii izolate din medii naturale, variind între $(6 \pm 0,42)$ și $(8 \pm 0,51)$ mm. Întrucât nu există un protocol standardizat de screening antimicrobian, tehnica de determinare a activității antimicrobiene a influențat în mod

categoric rezultatele. Astfel, metoda difuzimetrică cu discuri a furnizat, comparativ cu metoda difuzimetrică cu godeuri, rezultate mult mai bune. Evidențierea activității antimicrobiene a extractelor din struguri, coroborată cu activitatea antioxidantă a acestora, furnizează baza științifică necesară în vederea izolării și purificării unor compuși chimici bioactivi din extractele din struguri, compuși care ar putea fi utilizați, fără a se limita la aceste aplicații, în terapeutică, în scopul soluționării fenomenului de rezistență la antibiotice, precum și în industria alimentară, în scopul înlocuirii unor conservanți chimici și prevenirii alterării produselor alimentare, respectiv în scopul proiectării unor produse nutraceutice și cu beneficii pentru sănătate.

Revendicări

Produsul CREMĂ EMOLIENTĂ PENTRU TEN USCAT CU EXTRACT DE PIELIȚĂ/SÂMBURE (CULTURĂ ECOLOGICĂ VITIS VINIFERA L., SOIUL FETEASCĂ NEAGRĂ)

este caracterizat prin aceea că:

1. Crema emolientă pentru ten uscat este constituită dintr-un amestec de lanolină, alcool cetilic, lauril sulfat de sodiu (crema-bază) și extract hidroalcoolic obținut din pielită/sâmbure de struguri din cultură ecologică de *Vitis vinifera* L., soiul Fetească Neagră, procentul de extract utilizat în condițiile revendicării fiind de 7% (volum/masă).
2. Extractul hidroalcoolic din pielită/sâmbure de struguri din cultură ecologică de *Vitis vinifera* L., soiul Fetească Neagră, utilizat în cadrul revendicării, se caracterizează prin aceea că se obține prin macerare, timp de 24 de ore (din care 3 ore cu agitare magnetică), la temperatura camerei (22-23°C), într-un procent de 4 % masă uscată/volum solvent hidroalcoolic (50 % v/v).
3. Extractul hidroalcoolic din pielită de struguri din cultură ecologică de *Vitis vinifera* L., soiul Fetească Neagră utilizat în cadrul revendicării se caracterizează prin aceea că are un conținut total de compuși polifenolici în domeniul 2,50-3,50 mg-EAG/mL (EAG = echivalent acid galic), un conținut total de flavonoide în domeniul 3,00-4,50 mg-EQt/mL (EQt = echivalent quercetină), o activitate antioxidantă în domeniul 0,80–1,50 mg-EAA /mL (EEA = echivalent acid ascorbic), o acțiune inhibitoare antimicrobiană moderată, *in vitro*, asupra bacteriilor Gram pozitive selectate, cu valori corespondente ale concentrației minime inhibitorii în domeniul 820-4300 µg/mL, o eficiență antifungică scăzută față de tulpinile selectate.
4. Extractul hidroalcoolic din sâmbure de struguri din cultură ecologică de *Vitis vinifera* L., soiul Fetească Neagră utilizat în cadrul revendicării se caracterizează prin aceea că are un conținut total de compuși polifenolici în domeniul 4,50–7,50 mg/mL mg-EAG/mL (EAG = echivalent acid galic), un conținut total de

flavonoide în domeniul 4,20-7,70 mg-EQt/mL (EQt = echivalent quercetină), o activitate antioxidantă în domeniul 10,00–12,50 mg-EAA /mL (EEA = echivalent acid ascorbic), un spectru larg de acțiune, *in vitro*, asupra bacteriilor Gram pozitive selectate, cu valori corespondente ale concentrației minime inhibitorii în domeniul 850–4000 µg/mL, o eficiență antifungică selectivă și moderată față de tulpinile selectate.

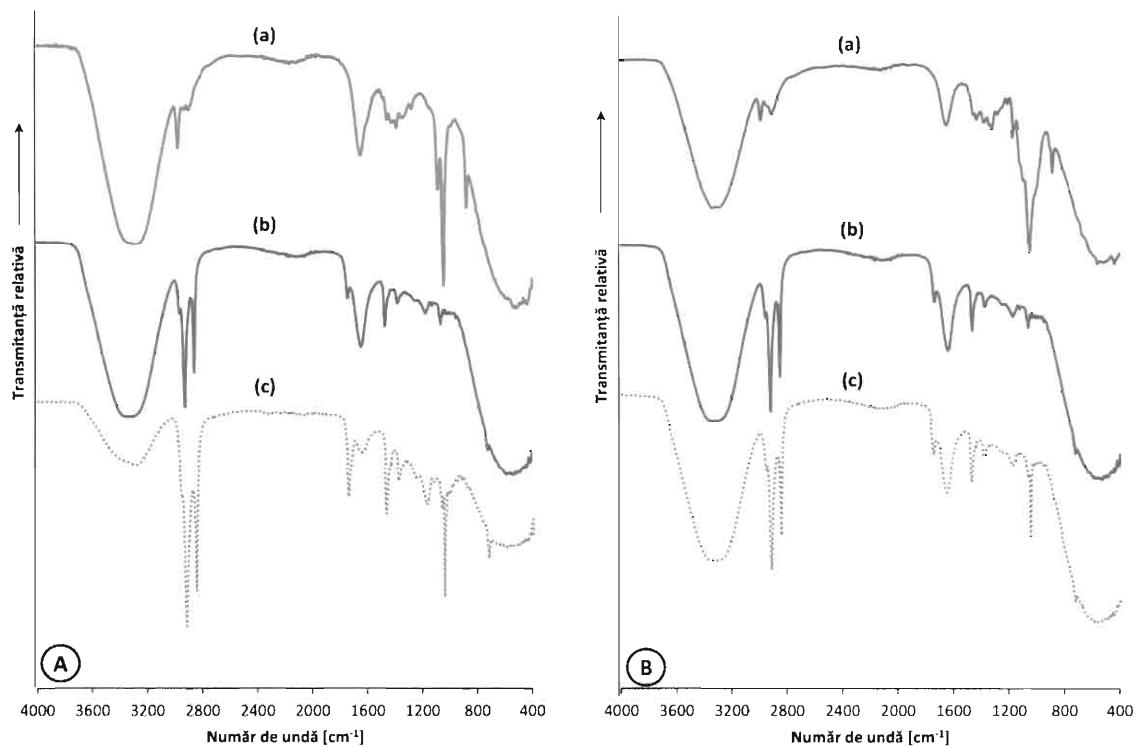


Figura 1. Spectrele FTIR pentru extractul hidroalcoolic din pielită/sâmburi de struguri (*Vitis vinifera L.*) din cultură ecologică – soi românesc Fetească Neagră, bază cremă ten uscat (lanolină, alcool cetilic, lauril sulfat de sodiu, apă) și crema pentru ten uscat cu extract hidroalcoolic (7%): **A** - (a) extract hidroalcoolic din pielită, (b) bază cremă ten uscat și (c) cremă emolientă pentru ten uscat cu extract hidroalcoolic (7%) din pielită; **B** - (a) extract hidroalcoolic din sămburi, (b) bază cremă ten uscat și (c) crema pentru ten uscat cu extract hidroalcoolic (7%) din sămburi.

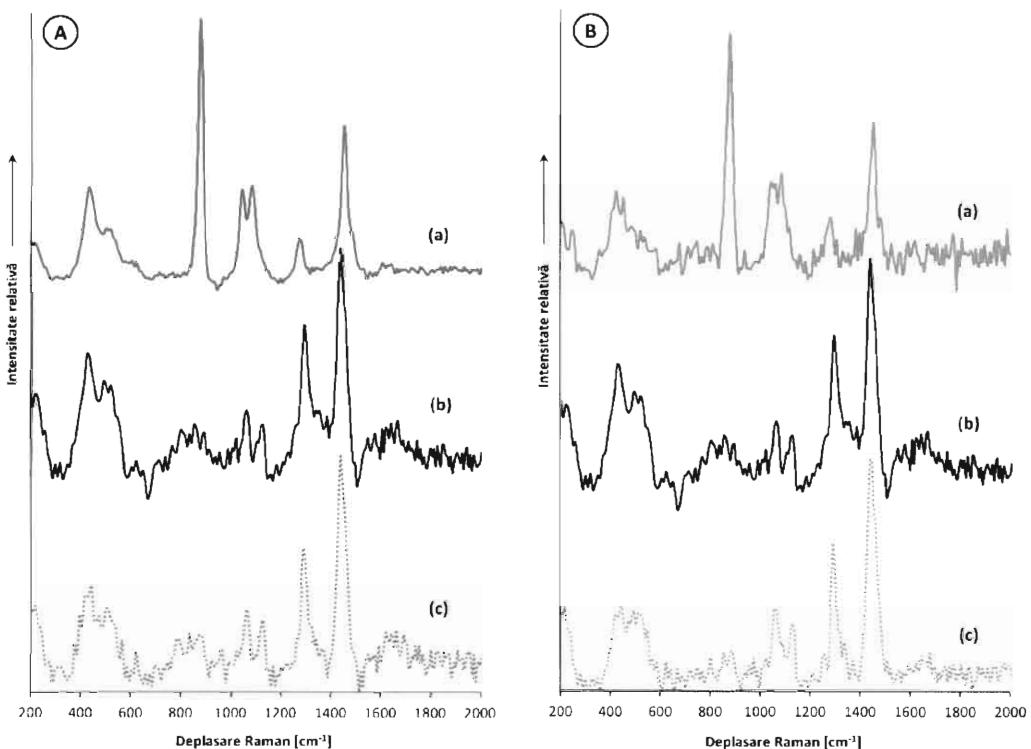


Figura 2. Spectrele Raman pentru extractul hidroalcoolic din pielită/sâmburi de struguri (*Vitis vinifera L.*) din cultură ecologică – soi românesc Fetească Neagră, bază cremă ten uscat (lanolină, alcool cetilic, lauril sulfat de sodiu, apă) și crema pentru ten uscat cu extract hidroalcoolic (7%): **A** - (a) extract hidroalcoolic din pielită, (b) bază cremă ten uscat și (c) cremă pentru ten uscat cu extract hidroalcoolic (7%) din pielită; **B** - (a) extract hidroalcoolic din sâmburi, (b) bază cremă ten uscat și (c) cremă pentru ten uscat cu extract hidroalcoolic (7%) din sâmburi.

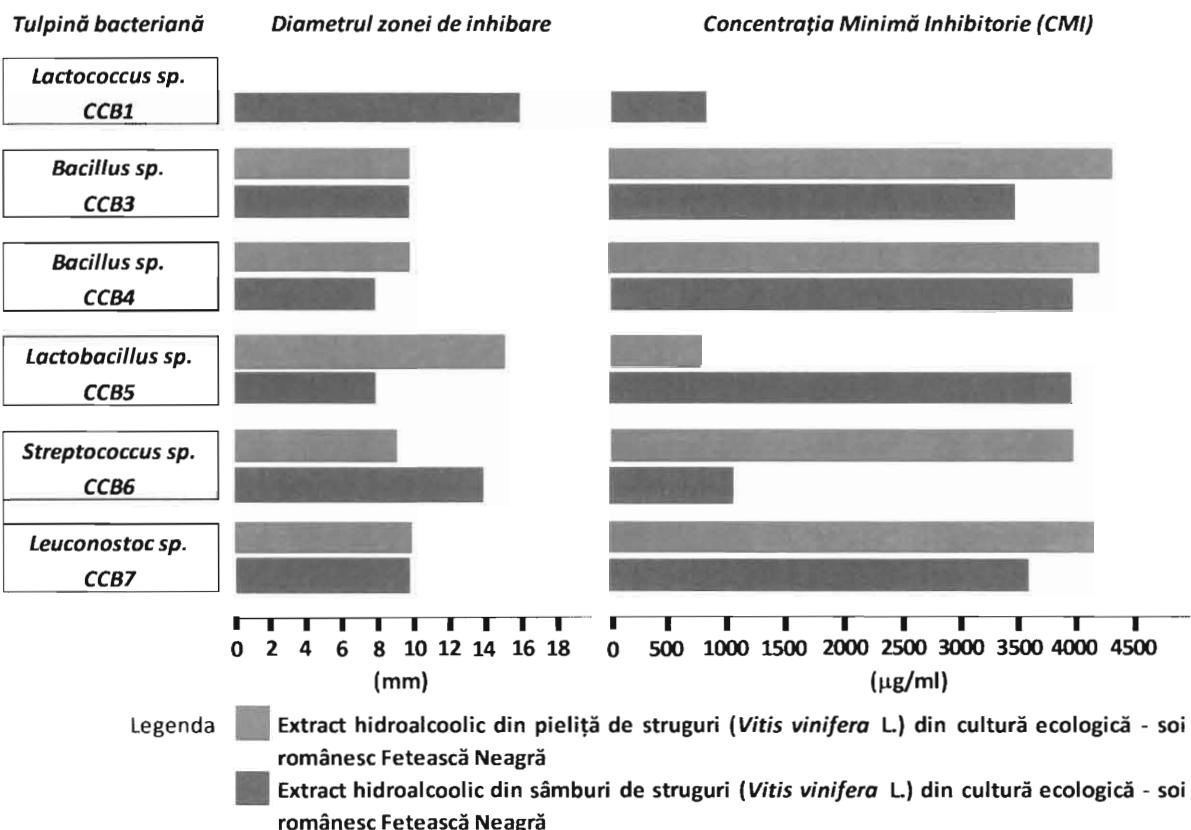


Figura 3. Valorile diametrului mediu al zonei de inhibare a creșterii bacteriene și concentrației minime inhibitorii (CMI) pentru extractele hidroalcoolice din pieliță și sămburi de struguri (*Vitis vinifera* L., soi Fetească Neagră – cultură ecologică) relativ la tulpinile bacteriene CCB1, CCB3, CCB4, CCB5, CCB6 și CCB7.

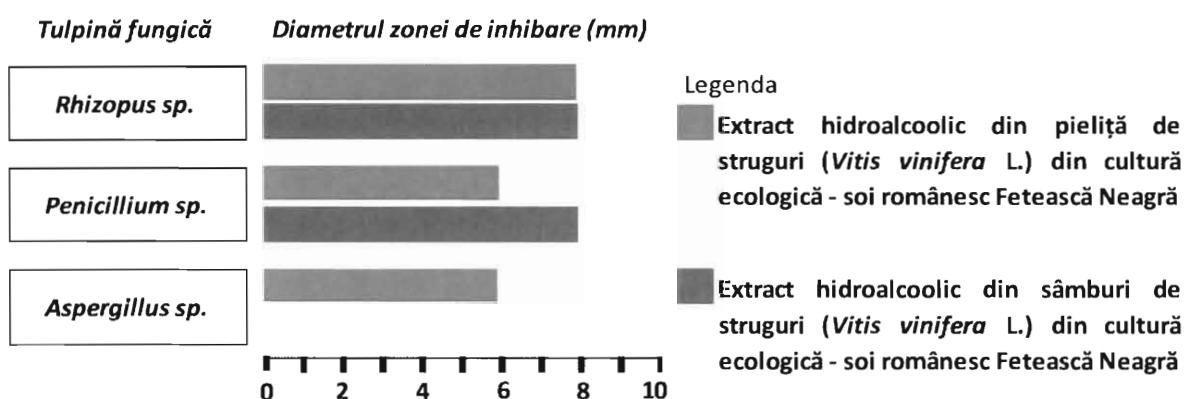


Figura 4. Valorile diametrului mediu al zonei de inhibare a creșterii fungice pentru extractele hidroalcoolice din pieliță și sămburi de struguri (*Vitis vinifera* L., soi Fetească Neagră – cultură ecologică) relativ la tulpinile fungice *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp. și *Aspergillus* sp.