



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/11/2022** BOPI nr. **11/2022**

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

(73) Titular:

- **UNIVERSITATEA VALAHIA DIN TÂRGOVIȘTE, ALEEA SINAIA, NR.13, TÂRGOVIȘTE, DB, RO;**
- **HYPERICI FARM S.R.L., STR.MAIOR EUGEN BREZISEANU, BL.24, PARTER, TÂRGOVIȘTE, DB, RO**

(72) Inventatori:

- **RĂDULESCU CRISTIANA, STR. JUSTIȚIEI NR. 23, TÂRGOVIȘTE, DB, RO;**
- **NICOLESCU CRISTINA MIHAELA, STR.SOARELUI, NR.17, TÂRGOVIȘTE, DB, RO;**

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

(56) Documente din stadiul tehnicii:
WO 2012/0560052 A1; RO 121004 B1;
KR 2002035925 A

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



RO 135101 B1

1 Invenția se referă la o cremă emolientă pentru ten uscat cu extract de pieleț/sâmbure
2 (cultură ecologică *Vitis vinifera L.*, soiul fetească neagră) cu aplicabilitate în domeniul cos-
3 metic sau dermatologic, în principal în scop antirid. Conform invenției, crema conține
4 lanolină, alcool cetilic, lauril sulfat de sodiu, extract hidroalcoolic din pieleț și/sau sâmbure
5 de struguri din cultură ecologică de *Vitis vinifera L.*, soi românesc Fetească Neagră. Din aso-
6 cierea componentelor din cremă rezultă un produs care hrănește profund și previne uscarea
7 pielii (efect hidratant, revitalizant, antimicrobian), repară și netezește linii de expresie fine,
8 previne îmbătrânirea (efect antirid).

9 Soiul autohton de Fetească Neagră, este soiul de strugure din România cu cel mai
10 ridicat potențial calitativ, cu aromă deosebită și un conținut de taninuri fine. Acest soi valoros
11 este foarte vechi, cunoscut încă din vremea dacilor, adaptat bine atât la condițiile de cultură
12 (câmpie/deal) cât și la cele climatice, fiind rezistent atât la ger cât și la secetă. Reprezentativ
13 pentru soiul Fetească Neagră este faptul că este autofertil (soi timpuriu), fiind astfel cultivat
14 în plantații pure, ecologice (cultură organică), fără a modifica profilul fitochimic al strugurelui.
15 Conform brevetului **RO 129328 A2** [Ranca, A.M. și Negraru, A., 2015] (Procedeu ecologic
16 de cultivare a soiului de viță de vie "fetească neagră"), care se referă la un procedeu de culti-
17 vare ecologică a soiului de viță de vie Fetească Neagră aplicat într-o fermă viticolă, trata-
18 mentele fitosanitare și cele de fertilizare aplicate mai multor soiuri de viță de vie pentru a le
19 eficientiza și adapta la condițiile deficitului de apă au totuși dezavantajul că se realizează cu
20 o serie de produși chimici de sinteză care, chiar dacă sunt de tip sistemic și se aplică în limi-
21 tele permise de legislația relevantă, alterează proprietățile strugurilor. Prin aplicarea invenției
22 mai sus menționate se precizează mai multe avantaje, printre care și obținerea unor struguri
23 naturali, fără reziduuri de substanțe chimice. În brevet se evidențiază faptul că este interzisă
24 folosirea produselor de sinteză pentru tratamente fitosanitare, iar sănătatea plantelor se
25 asiguă într-o manieră preventivă, fiind permise doar produsele bazate pe săruri minerale
26 simple (cupru, sulf, silicat de sodiu) sau extractele de plante, în limitele normelor stabilite de
27 legislația relevantă (Regulamentele CE nr. 834/2007 și nr. 889/2008).

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

42 În 2014 un raport privind evaluarea siguranței utilizării în cosmetică a 24 ingrediente
43 derivate din struguri (*Vitis vinifera L.*) [Fiume, M.M., și colab., *Int. J. Toxicol.*, 2014, 33,
44 48S] preciza utilizarea frecventă a unor ingrediente precum extractul de pieleț - "*Vitis*
45 *Vinifera* (Grape) Skin Extract" - și cel de sâmburi - "*Vitis Vinifera* (Grape) Seed Extract", ca
46 agenți de condiționare ai pielii, iar unele dintre aceste ingrediente pot funcționa ca antioxi-
47 danți, agenți de aromatizare și/sau coloranți. Fenolii ocupă locul trei din punct de vedere al

RO 135101 B1

abundenței în struguri (după carbohidrați și acizi), fenolii total extractibili fiind prezenți în proporții variabile în funcție de partea anatomică a fructului: sub 10% în pulpă, 60-70% în sămburi 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 prezenți în extract depinde de solventul folosit pentru extracție și de varietatea/soiul de *Vitis vinifera L.* utilizată. Principalii constituenți ai sămburilor de struguri sunt compușii fenolici reprezentați, pe baza extractelor de sămburi de struguri standardizate, în proporție de 92-95% de proantocianidine oligomerice [National Toxicology Program, Summary of Data for Chemical Selection, 2000]. Extractul de sămburi funcționează ca agent anticarie, antimătreață, antifungic, antimicrobial, antioxidant, agent aromatizant, stabilizator la lumină, agent pentru îngrijire/sănătate orală și agent de protecție solară. Extractul de oielită 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 utilizați 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]. Selecția etanolului ca solvent organic s-a bazat pe faptul că etanolul, în amestec cu apă, îmbunătățește solubilitatea componentelor 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 solvenții organici menționați anterior. Prezența etanolului în amestec contribuie la penetrarea solventului în zonele hidrofobe ale matricei sămburilor și la precipitarea proteinelor solubile din sămburi 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].

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

RO 135101 B1

1 pielii. În ceea ce privește compușii activi, tendințele actuale ale produselor cosmetice înregis-
trează două direcții: o întoarcere în trecut și un nou început, cu utilizarea ingredientelor
3 tradiționale și beneficiile cercetării moderne și a produselor testate clinic [**Cohen-Letessier,**
A., Ann. Dermatol. Venereol., 2009, 136, S367]. Polifenolii naturali, prin activitatea antioxi-
5 dantă confirmată relativ la speciile de oxigen radicalice, prezintă un interes constant în
domeniul cosmetic în scopuri antiîmbătrânire sau pentru aplicații nutraceutice. Strugurele
7 furnizează ingrediente active capabile să contracareze simptomele îmbătrânirii epidermice,
cum ar fi componentele fenolice, care pot îmbunătăți protecția împotriva radiațiilor solare și
9 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/**
11 **derivate sunt eficiente în îmbunătățirea îmbătrânirii premature** [**Sharif, A., și colab. Jnt.**
J. Cosmet. Sci., 2015, 37, 253] și ar putea reduce apariția cancerului de piele și întârzia
13 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
15 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
17 pentru întinerirea pielii prezintă un interes crescut, într-un studiu care a evaluat cremele
antiîmbătrânire comercializate, extractul de sămburi de struguri constituind unul din cele mai
19 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
21 chimici de sinteză, unii toxici, cancerigeni (categoria paragenilor, izotiazolinone, bronopol,
dimetilol hidantoină sau diazolidinil uree etc). Dată fiind preferința generală a consumatorilor
23 pentru produse naturale și grija acordată de către forumurile internaționale, referitoare la
interzicerea compușilor de sinteză în compoziția produselor cosmetice folosite
25 zilnic/săptămânal, invenția oferă consumatorilor și o soluție legată de chemofobie. Un alt
aspect, ar fi utilizarea extractului din soiul autohton, extrem de apreciat, Fetească Neagră,
27 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.
29 Compoziția chimică deosebită a acestui soi, Fetească Neagră, cu un conținut de resveratrol
("elixirul tinereții") și piceid (glucozid stilbenoid - derivat major al resveratrolului) remarcabil,
31 așa 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
33 necesară]

Sunt cunoscute din stadiul anterior al tehnicii produse/compoziții cum ar fi:
35 Documentul **WO 2012/056052 A1** [Moro Gonzalez, L.C., și colab. 2012] ("*Polyphenolic grape*
extract and cosmetic product comprising said extract") I PCT/ES2010/070689, care se referă
37 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
39 exprimat ca echivalență 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
41 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
43 struguri, deși sunt preferat în special strugurii roșii. De regulă, aceste extracte provin din
peliță după presarea strugurilor. Din extractul de polifenolic de struguri obținut și caracterizat
45 așa cum s-a descris anterior, au fost realizate compoziții cosmetice pentru administrare
topică, folosind metode convenționale, printre care și o cremă hidratantă. Aceasta conține

RO 135101 B1

extractul polifenolic descris într-o concentrație de 2-10% din greutate, dar și cel puțin un vehicul constând din excipienți acceptabili din punct de vedere cosmetic, cum ar fi ulei de trandafir, extract de caviar, ulei de jojoba și germeni de grâu. 1
3

Documentul **ES 2228284 B1** [Quilis, L.J. și Casani, AS, 2003] ("**Composiciones que comprenden un extracto de hollejo, semillas y raspas de uva negra**") se referă la extractul natural din pielită, semințe și resturi de struguri negri, bogat în compuși antioxidanți (polifenoli și antociani), ce poate fi utilizat la prepararea produselor alimentare neactive îmbogățite cu antioxidanți naturali, precum și în prepararea compozițiilor 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 pielită, sămburi și resturi de struguri negri, iar ca solvent apa) pentru a obține un extract brut; separarea fracțiunii cuprinzând componentele antioxidante (polifenoli și antociani) din extractul brut pentru a obține un extract concentrat, și, opțional, un proces de uscare sau îndepărtare a solventului pentru a obține extractul concentrat sub formă de pulbere uscată. Într-o realizare particulară, o compoziție cosmetică furnizată de această invenție include un vehicul care cuprinde unul sau mai mulți excipienți cosmetici acceptabili; autorii prezentei invenții au observat că respectivul extract este absorbit percutanat, permițând utilizarea acestuia în administrarea topică. Un exemplu de astfel de compoziție cosmetică tip cremă conține: extract uscat de *Vitis vinifera*, extract glicolic de *Fucus vesiculosus*, extract glicolic de *Centella asiatica*, alantoină, extract glicolic Ginko biloba, vitamina E, emulsie O/A. 5
7
9
11
13
15
17
19

Documentul **WO 2010/056675 A2** [Jacobs, J., June Jacobs Labs, 2012] ("**Antioxidant compositions for the cleansing and conditioning of skin**")/PCT/US 2009/063891, se referă la compoziții cosmetice antioxidante 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 compoziții 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 ingredientele 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 glicerina, butilenglicol, propilenglicol, apă, diverse uleiuri (jojoba, migdale, soia, floarea soarelui, caise etc.) și altele asemănătoare. 21
23
25
27
29
31
33
35
37
39
41
43

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 45
47

RO 135101 B1

1 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).
3 În cuprinsul brevetului menționat, expresia "extract" este înțeleasă ca însemnând un fito-
compozit care cuprinde toate componentele prezente în *Vitis vinifera* "roșie" corespunzătoare
5 echilibrului lor natural. De preferință, extracția se efectuează utilizând o "metodă hidro-
alcoolică" care nu introduce compuși chimici care dăunează sănătății umane; prin urmare,
7 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 pre-
9 ferabil sub formă de cremă, gel sau unguent. Un exemplu de compoziție sub formă de cremă
include: glicerina monostearat, alcool cetilic, ulei mineral, ulei de susan, glicerina, extract
11 polifenolic din soi roșu de *Vitis vinifera*, extract de *Polygonum cuspidatum*, resveratrol
adăugat, apă.

13 Documentul **RO 121004 B1** [Maftai, E.A., și colab. 2006] ("*Compoziție cosmetică cu*
acțiune anticelulitică și de reducere a depunerilor adipoase") se referă la o compoziție cos-
15 metică cu acțiune anticelulitică și de reducere a depunerilor adipoase, cu extracte vegetale,
ce constă în aceea că are în componență 3...8 părți extract hidroalcoolic de *Vitis vinifera*,
17 conținând minimum 2,5% substanță uscată, părțile fiind exprimate în greutate. Compoziția
cosmetică, conform invenției, datorită complexului bioactiv vegetal, asigură hidratarea
19 epidermei și stopează procesele de îmbătrânire a pielii, datorită asocierii complexului bioactiv
vegetal cu adjuvanții cosmetici și apă. Un exemplu de cremă anticelulitică, hidratantă are în
21 componență: lanolină anhidră, alcool cetilic, ceară galbenă, cetii fosfat de dietanol amoniu,
extract hidroalcoolic de iederă, extract hidroalcoolic de viță de vie, extract hidroalcoolic de
23 șovârf, ulei vegetal, ulei de levănțică, apă distilată, conservanți/antioxidanți.

Documentul **RO 127720 B1** [Postescu, I.D., și colab. 2016] ("*Gel fotochemoprotector*
25 *și procedeu de preparare a acestuia*") se referă la o compoziție pentru un gel cu proprietăți
de fotochemoprotectie, destinat aplicării topice pentru uz cosmetic, în vederea protejării pielii
27 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
29 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,
31 glicerina, p-hidroxibenzoat de metil). Compoziția farmaceutică a produsului prezentat în
invenție își menține stabilitatea fizică și chimică o perioadă lungă de timp. Efectele gelului
33 fotochemoprotector la nivelul pielii sunt multiple: reduce efectul radicalilor liberi generați de
expunerea la radiații ultraviolete asupra componentelor din piele (acizi nucleici, lipide,
35 proteine), inhibă apariția de mutații în celulele normale și îmbunătățește repararea ADN-ului.
Într-un alt aspect, invenția se referă la un procedeu de preparare a unui gel fotochemo-
37 protector definit mai sus, în care peste un polimer carboxivinilic cu masă moleculară mare,
dispersat într-un amestec format din apă și glicerina, și menținut în repaus pentru hidratare,
39 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, dizolvați
41 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 -
43 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.
45 Procedeu 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
47 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 îndepărtarea prin

RO 135101 B1

filtrare a fracțiunii solide, filtratul a fost analizat pentru evaluarea conținutului în polifenoli totali, proantocianidine, antiociani, și activității antioxidante (AO). Randamentul la extracție, 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 intolerantă.

Documentul **RO 122894 B1** [Burgehelea, 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. Procedeu conform invenției constă în aceea că se tratează strugurii 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 nehiproscopice, 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 invenției; de asemenea valorile pH-ului extractului polifenolic de struguri utilizat ca ingredient al compozițiilor cosmetice (tip cremă hidratantă) nu sunt relativ apropiate (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 (exemplu: ulei de trandafir, extract de caviar, germeni 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/sămburi de struguri (brevet **WO 2012/056052**, brevet **ES 2228284 B1**, brevet **WO 2010/056675 A2**, brevet **WO 2011/055222 A2**, brevet **RO 121004 B1**);

- extracția solid-lichid utilizând ca solvent numai apa (chiar în cazul utilizării ca materie primă a unui amestec de piele, sămburi 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 **ES 2228284 B1**);

- domeniul larg de concentrație (exemplu: 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**);

RO 135101 B1

1 - nu se menționează realizarea unor studii/teste clinice în fază preliminară a compozițiilor cosmetice ce includ extracte de *Vitis vinifera* ca atare (din pieliță/sâmburi sau
3 combinații ale acestora) sau în combinație cu alte extracte naturale (brevet **ES 2228284 B1**,
brevet **WO 2010/056675 A2**, brevet **WO 2011/055222 A2**, brevet **RO 121004 B1**);

5 - utilizarea unor compuși chimici de sinteză (exemplu: trietanolamină, esterii metilic/propilic ai acidului p-hidroxibenzoic) în prepararea compozițiilor cosmetice (deși nu
7 există suficiente date științifice relativ la comportarea fiecărui astfel de ingredient) poate induce potențiale riscuri legate de formarea unor contaminanți chimici (exemplu: N-nitrozo
9 compuși (NOC)) [Fiume, M.M., și colab., Int. J. Toxicol., 2015; Elder, R.E. (ed), J. Am. Coli. Toxicol., 1983; Fiume, M.M., și colab., Int. J. Toxicol., 2017] (brevet **RO 127720 B1**).

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

15 Compoziția conform invenției, 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 pieliță sau
17 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
19 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
21 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
23 quercetină), o activitate antioxidantă în domeniul 0,80-1,50 mg-EAA/mL (EAA = echivalent acid ascorbic), o acțiune inhibitoare antimicrobiană moderată, *in vitro*, asupra bacteriilor
25 Gram pozitive selectate, cu valori corespondente ale concentrației minime inhibitorii în domeniul 820-4300 ug/mL, o eficiență antifungică scăzută față de tulpinile selectate. Extrac-
27 tul 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
29 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
31 corespondente ale concentrației minime inhibitorii în domeniul 850-4000 μg/mL, o eficiență antifungică selectivă și moderată față de tulpinile selectate.

33 Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

35 - 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
37 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
39 produși chimici de sinteză. Lipsa pesticidelor remanente în porțiunile anatomice ale plantelor utilizate ca sursă de materii prime, este un deziderat al domeniului farmaceutic și cosmetic,
41 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;

43 - 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
45 nu implică generarea de produse secundare/intermediare potențial toxice, iar tehnologiile de extracție a componentelor/principiilor active cosmetice presupun consumuri energetice
47 minime conform principiilor tehnologiilor "prietenoase cu mediul". Sunt create astfel premisele unei tehnologii de produse ușor de aplicat;

RO 135101 B1

- se utilizează ingrediente bioactive ale căror proprietăți fitochimice, antibacteriene și antifungice au fost demonstrate prin investigații analitice complexe; astfel, se consideră drept avantaje: (a) utilizarea amestecului etanol-apă, ca solvent de extracție 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 prezenta cerere de brevet, CTP obținut pentru extractele de pieleț/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 pieleț/sâmbure din soiul Fetească Neagră, nu sunt precizate/disponibile date relativ la aceste aspecte;
- crema bază utilizată pentru înglobarea ingredientelor bioactive (extracte de pieleț/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 pieleț, respectiv din sâmbure de strugure din soiul Fetească Neagră, cultivat ecologic. Pieleța sau 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 extracție a fost macerarea la temperatura camerei (22-23X, timp de 24 h, prin contactare cu un solvent constând dintr-o soluție hidroalcoolică 50% (v/v). Proporția solid-lichid (pieleț/sâmbure uscate - solvent hidroalcoolic) utilizată la extracție a fost de 4% masă/volum. Operația s-a desfășurat în recipient închis, primele 3 h s-a aplicat agitare magnetică, iar în următoarele 21 h s-a menținut contactul cu solventul utilizat pentru macerare. După 24 h, amestecul a fost separat prin filtrare, iar filtratul (extractul de pieleț/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 pieleț/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 pieleț/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

1 cromatografic al compușilor cu potențial bioactiv. Au fost realizate teste comparative între
2 extractele utilizate, crema-bază și cremele care fac obiectul invenției prin spectroscopie
3 vibrațională în IR și Raman; prin aceste investigații experimentale s-a urmărit identificarea
4 unor modificări de structură, dar și evidențierea înglobării unor compuși cu potențial bioactiv
5 din extracte, în crema-extract pieleț/sâmbure propusă spre brevetare (fig. 1 și fig. 2).
6 Determinarea Resveratrolului (*cis*, *trans*) și a Piceidului (*cis*, *trans*) prin Cromatografia de
7 Lichide de Înaltă Performanță (HPLC) în extractele hidroalcoolice din pieleț/sâmburi de *Vitis*
8 *vinifera* L., soi românesc Fetească Neagră, s-a realizat utilizând metoda descrisă de Rosa
9 M. Lamuela-Raventos și colab., în articolul *Direct HPLC Analysis of cis - and trans-*
10 *Resveratrol and Piceid Isomers in Spanish Red Vitis vinifera Wines* [Rosa M. Lamuela-
11 **Raventos și colab., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(2), 281-283**.
12 Standardul față de care s-au raportat valorile a fost etalon de *cis*-, *trans*-resveratrol.

13 Determinările de pH și conductivitate electrică a extractelor utilizate pentru prepa-
14 rarea cremelor care fac obiectul invenției au arătat valori în intervalul 4,4-4,7 pentru pH
15 (extract pieleț) și 5,4-5,7 pentru pH (sâmbure), respectiv în intervalul 290-310 $\mu\text{S/cm}$ (extract
16 pieleț) și 155-175 $\mu\text{S/cm}$ (sâmbure) pentru conductivitatea electrică.

17 Determinarea conținutului total de polifenoli s-a realizat prin spectrometrie de absorbție
18 în ultraviolet-vizibil, metoda Folin-Ciocalteu, conform descrierii incluse în *Phytochemical*
19 *Profiles, Antioxidant and Antibacterial Activities of Grape (Vitis vinifera L.) Seeds and Skin*
20 *from Organic and Conventional Vineyards* [Radulescu, C. și colab., **PLANTS-Basel, 2223-**
21 **7747, 2020, 9, 11, 1470**], care are la bază un proces chimic de oxidare a polifenolilor în
22 prezența reactivului Folin-Ciocalteu. Citirile s-au efectuat la lungimea de undă 765 nm, în
23 cuve cu lungimea drumului optic de 10 mm, iar conținutul total de polifenoli s-a determinat
24 folosind o curbă de calibrare în acid galic ca antioxidant de referință, valorile fiind exprimate
25 în miligrame echivalent acid galic per mL extract (mg-EAG/mL).

26 Determinarea conținutului total de flavonoide s-a realizat conform procedurii descrise
27 în *Influence of Extraction Method on Chemical Composition from Red Grapes Skin Extract*
28 [Nicolescu, CM., și colab., **Journal of Science and Arts, 1844-9581, 2019, 1, 201, 208**],
29 metoda aplicată fiind spectrofotometrică bazată pe formarea unor combinații complexe din
30 reacția ionului Al^{3+} cu grupările carbonil și hidroxil din structura flavonoidelor. Citirile s-au
31 efectuat la lungimea de undă 510 nm, în cuve cu lungimea drumului optic de 10 mm, iar
32 valorile conținutului total de flavonoide s-au determinat cu ajutorul unei curbe de calibrare
33 ce folosește quercetina ca flavonoid de referință, valorile sunt exprimate în miligrame
34 echivalent quercetina per mililitru extract (mg-EQt/mL).

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

43 Studiul activității antimicrobiene. Materialul biologic: Extractele din pieleț și sâmburii
44 strugurilor au fost obținute cu asigurarea condițiilor de sterilitate pentru materialele utilizate
45 și pentru mediul de lucru în ansamblul său. Un număr de șase tulpini de bacterii, respectiv
46 trei tulpini de fungi din Colecția de Culturi a Institutului de Cercetări Multidisciplinare pentru
47 Știință și Tehnologie - Universitatea "Valahia" din Târgoviște au fost testate cu privire la

RO 135101 B1

inhibarea creșterii în prezența compușilor antimicrobieni existenți în extractele hidroalcoolice obținute din struguri. Tulpinile au fost alese astfel încât să provină din diferite habitate (pro- 1
duse alimentare, sol, aer - podgoria de proveniență a strugurilor) și să aparțină unui număr 3
divers de genuri. Se cunoaște faptul că multe tulpini de *Bacillus* se utilizează pe scară largă 5
în biotehnologie, fiind considerate GRAS (Generally Recognized As Safe) de către Food and 7
Drug Administration (FDA). De asemenea, numeroase tulpini de *Bacillus* prezintă trăsături 9
benefice de promovare și protecție a creșterii plantelor și au un potențial mare de a fi utilizate 11
ca agro-inoculanți, deoarece sunt formatori de spori și ușor de formulat și conservat [**Siculia 13
O.A., și colab., Acta Horti, 2017, 1164, 257**]. Numeroase specii de bacterii lactice (LAB), 15
bacterii cu multiple aplicații în industria alimentară, fac parte din microbiota intestinală a 17
oamenilor și animalelor [**Vaughan, E.E., și colab., FEMS Microbiology Review, 2005, 29, 19
477**], aspect care a stat, de asemenea, la baza selectării tulpinilor de bacterii mai sus mențio- 21
nate, în contextul temei propunerii de brevet. Tulpinile de mucegaiuri propuse în studiu 23
aparțin unor genuri potențial producătoare de micotoxine pielii [**Dantigny, P., și colab., CRC 25
Press, Taylor & Francis Group, 2021**] și potențial prezente în microbiota pielii [**Hammoudi, 27
N., și colab., Sci Rep, 2021, 11, 3777**]. Tulpinile bacteriene au fost izolate și caracterizate 29
prin tehnici microbiologice clasice. Izolarea culturilor pure de bacterii a fost efectuată din 31
diferite habitate (alimente de origine animală și alimente de origine vegetală, aer), după 33
repicări succesive, astfel încât să se evite contaminarea microorganismelor utilizate ca test. 35
Pentru creșterea bacteriilor s-a folosit bulion de carne agarizat ($pH = 6,8 \pm 0,2$), iar incubarea 37
s-a efectuat la $37 \pm 0,2^\circ C$. Caracterizarea macroscopică și microscopică a coloniilor a fost 39
făcută în conformitate cu Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Culturile pure izolate 41
au fost menținute pe bulion nutritiv agarizat, la $4^\circ C$. Izolarea tulpinilor de fungi din medii 43
naturale a fost realizată prin inocularea (1 mL) din diluții seriale (10^{-3} - 10^{-6}) în plăci Petri cu 45
mediu Cartof - Dextroză - Agar (PDA). Plăcile au fost incubate la $28^\circ C$ timp de o săptămână, 47
apoi coloniile fungice s-au izolat sub formă de culturi pure. Identificarea genului fungilor a
fost efectuată prin examinări macroscopice și microscopice, în funcție de culoarea coloniei,
forma acesteia, prezența hifelor, conidii, conidiofori și dispunerea sporilor.

Determinarea activității antimicrobiene a extractelor de struguri. 29

Determinarea activității antimicrobiene a extractelor hidroalcoolice din struguri (peliță, 31
sâmburi) a fost efectuată în medii nutritive solide, prin aplicarea metodei difuzimetrice (Kirby- 33
Bauer), care a permis determinarea concomitentă a spectrului de sensibilitate a microorga- 35
nismelor (tulpini de bacterii și respectiv mucegaiuri), cât și a valorii concentrației minime de 37
inhibiție (CMI). S-au folosit două metode de evidențiere a activității antimicrobiene: tehnica 39
discurilor impregnate cu extracte (tehnica difuzimetrică cu discuri), standardizată, metodă 41
recomandată de NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standardisation) și 43
tehnica difuzimetrică cu godeuri. Pentru tulpinile de bacterii izolate, un volum de cultură 45
proaspătă ($20-50 \mu L$ - în funcție de diametrul plăcii Petri), cu densitatea optică la 600 nm 47
(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 1 h în extractele din peliță/sâmburi,
pregătite anterior conform protocolului descris. Discurile au fost așezate la la aproximativ 15
mm de periferia plăcii și respectiv la 30 mm unul de celălalt. Plăcile au fost incubate la $37^\circ C$
timp de 48 h. 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 malt) agarizat însămânțat "în

RO 135101 B1

1 pânză" cu un inocul standardizat din fiecare tulpină de mușcăi testată, s-au stanțat godeuri
(5 mm diametru) la aproximativ 15 mm de periferia plăcii și respectiv la 30 mm unul de
3 celălalt. În fiecare godeu, fără a se depăși marginile, au fost repartizate extractele din struguri
(10 μ L), ca atare (câte 2 extracte a 2 probe fiecare pe o placă). Plăcile au fost incubate la
5 temperatura de 25°C timp de 3 zile. Citirea a constat, ca și în cazul determinării activității
7 antibacteriene, în aprecierea mărimii zonelor de inhibiție induse de extracte, zone în care
9 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
11 corespunzătoare celor 3 testări. Valoarea concentrației minime de inhibiție a extractelor
13 obținute din struguri s-a determinat prin metoda diluțiilor în mediu lichid. Un inocul stan-
dardizat al tulpinii testate a fost însămânțat într-un gradient discontinuu de concentrații ale
15 extractului (pieliță/sâmburi), în tuburi cu bulion nutritiv. După incubarea adecvată, la tem-
peratura de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ timp de 48 h, s-au citit valorile CMI prin observarea macroscopică a
17 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
19 extractul respectiv. Pentru prepararea inoculului standardizat s-au utilizat tulpini microbiene
în vârstă de 18-24 h, prelevând colonii identice care au fost suspensionate în soluție salină
sterilă - inocul reprezentativ; mărimea inoculului a fost standardizată pe bază spectrofoto-
metrică, 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
21 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
23 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 produ-
25 sului cosmetic), punctul 5 (Utilizare normală și rațional previzibilă), punctul 6 (Expunerea la
produsul cosmetic), punctul 7 (Expunerea la substanțe), punctul 8 (Profilul toxicologic al
27 substanțelor) și punctul 10 (Informații cu privire la produsul cosmetic), către producătorul
Hyperici Farm SRL, de către laboratorul/persoană acreditat/ă. Astfel, au fost efectuate un
29 teste pentru verificarea compatibilității produselor cosmetice cremă emolientă pentru ten
uscat cu extract de pieliță/sâmbure (cultură ecologică vitis vinifera I, soiul fetească neagră)
31 prin aplicare dermală unică în condiții ocluzive (pach-test) în condiții experimentale
exagerate, la subiecți umani cu vârsta cuprinsă între 15 și 65 de ani, pe bază de accept
33 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
35 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.
37 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
39 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
41 a acestor creme emoliente cu extract de sâmbure/pieliță din cultură ecologică de Fetească
Neagră. De asemenea, se precizează conform art. 13 din Regulamentul (CE) no. 1223/2009
43 al Parlamentului European privind produsele cosmetice, că produsul trebuie notificat prin
Portalul pentru Notificarea Produselor Cosmetice (CPNP).

45 Evaluarea modificărilor de structură prin spectroscopie vibrațională

47 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 înconjurate 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 comificat 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 afară de influența asociată factorilor de mediu, curățarea zilnică cu săpun sau agenți 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 îndepărtate este redusă, îndepărtarea 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 aromatice 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 $3500-3100\text{ cm}^{-1}$ (bandă intensă în spectrul extractului de piele centrată la $\sim 3294\text{ cm}^{-1}$ și respectiv la $\sim 3279\text{ cm}^{-1}$ în spectrul cremei cu extract de piele) 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 $\sim 2978\text{ cm}^{-1}$ (maxim de intensitate medie prezent în spectrul extractului de piele) 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 distincte de la 2916 și 2849 cm^{-1} pot fi atribuite conformației catenei alchilice lipidice (lanolină) fiind asociate vibrațiilor de întindere CH_2 asimetric și respectiv simetric [Carrer și colab., *Pharmaceutics*, 2018, 73]; ambele maxime pot fi clar observate în spectrul bazei-cremă și cel al cremei cu extract de piele. Deplasarea poziției maximului de la 2849 cm^{-1} către

RO 135101 B1

1 numere de undă mai mari indică, în general, o creștere al gradului de dezordine al catenei
(de la conformație ortorombică, hexagonală la cea de lichid cristalin); o comportare similară
3 o poate avea și maximul de la 2916 cm^{-1} deși vibrațiile de întindere simetrice sunt mai senzi-
titive la modificările conformaționale [**Carrer și colab., *Pharmaceutics*, 2018, 73**]. Maximul
5 spectral localizat la $\sim 1736\text{ cm}^{-1}$ poate fi asociat vibrațiilor de întindere carbonilice (C=O)
[**Westfall, A., și colab., *Antioxidants*, 2020, 9, 486; Pasiieczna-Patkowska, S. și Olejnik,**
7 **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
9 medie).

Maximul spectral de intensitate medie localizat la 1641 cm^{-1} poate fi asociat vibrațiilor
11 de întindere C=C aromatice prezente în taninurile condensate [**dos Santos, G.F., și colab.,**
***Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc*, 2016, 153, 94**] precum și vibrațiilor de
13 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*
15 ***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
17 [**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
19 CH_2 și CH_3 (polizaharide asociate pereților celulari, lipide și proteine) [**Turker-Kaya, S., și**
colab., *Molecules*, 2017, 22, 168], vibrațiilor de întindere C=C-C asociate nucleului aromatic
21 [**Agatonovic-Kustrin, S., și colab., *Mod. Chem. Appl.*, 2013, 1, 110**], vibrațiilor de îndoire
asociate ciclurilor aromatice (flavonoide) [**Oliveira, R.N., și colab., *Materia (Rio J.)*, 2016,**
23 **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 $900\text{-}1160\text{ cm}^{-1}$
25 (maxime de intensitate crescută, distincte îndeosebi în spectrul extractului de pieleță - 1043
și 1084 cm^{-1} - dar și al spectrului bazei-cremă și cremei cu extract la $\sim 1060\text{ cm}^{-1}$) maximele
27 spectrale pot fi asociate vibrațiilor de întindere C-O ale fragmentelor glicozidice și într-o
măsură mai redusă vibrațiilor de întindere aromatice C-O [**Westfall, A.,și colab.,**
29 ***Antioxidants*, 2020, 9, 486**], Domeniul spectral $1150\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ prezintă benzi multiple de
intensitate variabilă atribuite vibrațiilor de întindere C-O și vibrațiilor de îndoire C-O-H aso-
31 ciate fenolilor, esterilor, acizilor carboxilici și alcoolilor [**Westfall, A., și colab., *Antioxidants*,**
2020, 9, 486; Coates, J., *Interpretation of Infrared Spectra, A Practicai Approach*, 2000,
33 **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
35 vibrațiilor de deformare C-H aromatice 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.,**
37 **și colab., *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 3493**] și vibrațiilor de deformare C-O (alcooli
secundari, esterii alifatici) [**Turker-Kaya, S., și colab., *Molecules*, 2017, 22, 168;**
39 **Agatonovic-Kustrin, S., și colab., *Mod. Chem. Appl.*, 2013, 1, 110**]. Vibrațiile de întindere
O-H și C-OH (polizaharide componente ale pereților celulari) pot fi asociate maximului
41 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-
43 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-**
45 **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 pieleță prezintă
47 de asemenea maxime spectrale asociate alcoolului cetilic localizate la $\sim 1640, 1464$ (vibrații

RO 135101 B1

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; Pasiieczna-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 ~1161 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 aromatic [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 sugerează o înglobare avansată a extractului în CB; proporția redusă (7%) a extractului în formulare determină totodată suprapunerea/combinarea maximelor intense asociate componentelor 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 ~3340 cm⁻¹ prezentă atât în spectrul CB cât și în cel al CES poate fi atribuită vibrațiilor de întindere OH asociate solventului de extracție, 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

RO 135101 B1

1 asimetrice și respectiv simetrice [Coates, J., **Interpretation of Infrared Spectra, A**
2 **Practical Approach, 2000, 10815**], atribuite în principal lanolinei, dar și lauril sulfatului de
3 sodiu [SpectraBase, John Wiley & Sons Inc., Lanolin, 2021; SpectraBase, John Wiley
4 & Sons Inc., Sodium Lauryl sulfate, 2021]. În domeniul spectral 1800-1300 cm^{-1} spectrele
5 CB și CES prezintă o serie de maxime spectrale de intensitate variabilă, atribuite în special
6 vehiculului (CB), dar și extractului de sămburi, prezente la: 1736 cm^{-1} (vibrații de întindere
7 asociate grupelor carbonil - aldehydă, ester - atribuite compușilor din extract și lanolinei)
8 [SpectraBase, John Wiley & Sons Inc., Lanolin, 2021], ~1638 cm^{-1} (vibrații de întindere
9 C=C asociate compușilor fenolici și influenței caracterului aromatic al acestora) [Heredia-
10 Guerro, J.A., și colab., **FPLS. Plant Biophysics and Modeling, 2014, 5, 305**; Coates,
11 J., **Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach, 2000, 10815**], 1464 cm^{-1}
12 (vibrații de îndoire metil asimetrice asociate scheletului alchilic - alcool cetilic, lanolină -
13 conjugate cu vibrații de întindere ale inelului aromatic - compuși fenolici din extract)
14 [SpectraBase, John Wiley & Sons Inc., Lanolin, 2021; SpectraBase, John Wiley & Sons
15 Inc., Cetyl alcohol, 2021; Coates, J., **Interpretation of Infrared Spectra, A Practical**
16 **Approach, 2000, 10815**], 1375 cm^{-1} (vibrații de deformare angulare C-O-H din fenoli
17 conjugate cu vibrații de întindere și îndoire dimetil/izometil) [SpectraBase, John Wiley &
18 Sons Inc., Lanolin, 2021; daRocha, J.C., și colab., **Int. J. Electrochem. Sci., 2012, 7,**
19 **11941**, Coates, J., **Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach, 2000,**
20 **10815**]. Maximele spectrale de intensitate redusă de la 1172 și 1060 cm^{-1} pot fi asociate
21 suprapunerii maximelor datorate extractului (vibrații de întindere C-O esterice și C-H aro-
22 matic) și componentelor CB (vibrații de întindere C-C ale catenelor alifatic) [SpectraBase,
23 John Wiley & Sons Inc., Lanolin, 2021; SpectraBase, John Wiley & Sons Inc., Sodium
24 Lauryl sulfate, 2021; SpectraBase, John Wiley & Sons Inc., Cetyl alcohol, 2021].

25 Prezența resveratrolului (*cis*, *trans*) și a piceidului (*cis*, *trans*) s-a investigat prin
26 HPLC-UV/DAD în extractele hidroalcoolice din pielită/sămburi de *Vitis vinifera L.* Cromatogramele
27 au arătat, pentru extractele analizate, la 285 nm, *cis*-resveratrol, iar la 306 nm,
28 *trans*-resveratrolul. Valorile cantitative, exprimate ca medie \pm deviație standard ($n = 3$),
29 obținute au fost de $3,65 \pm 0,42$ și $10,14 \pm 1,02$ $\mu\text{g/g}$ s.u. *cis*-resveratrol pentru extractele de
30 pielită, respectiv sămbure de Fetească Neagră, iar pentru *trans*-resveratrol, valorile au fost,
31 respectiv, de $2,92 \pm 0,01$ și $1,72 \pm 0,49$ $\mu\text{g/g}$ s.u. Valorile obținute pentru glucozid stilbenoizii,
32 *trans*-piced, respectiv *cis*-piceid în extractele hidroalcoolice din pielită/sămbure sunt: $13,48$
33 $\pm 1,01$ și $29,01 \pm 2,71$ $\mu\text{g/g}$ s.u. (*trans*-piced), respectiv $3,01 \pm 0,55$ și $9,40 \pm 0,51$ $\mu\text{g/g}$ s.u.
34 (*cis*-piced).

35 Activitatea antibacteriană a extractelor din pielită și sămburi. Extractele hidroalcoolice,
36 din pielită sau sămburi de struguri (*Vitis vinifera L.*), soiul Fetească Neagră provenit din
37 cultură ecologică, au prezentat acțiune antibacteriană față de tulpinile Gram pozitive testate.
38 Efectul antibacterian diferențiat manifestat de extractul de pielită sau sămburi relativ la
39 tulpinile bacteriene testate a fost evaluat prin intermediul diametrului de inhibare a creșterii
40 bacteriene și determinarea CMI (fig. 3). Diametrul zonei de inhibare a creșterii s-a situat în
41 limitele 8-16 mm, valorile prezentate (fig. 3) reprezentând media aritmetică a trei determinări,
42 fiind inclus diametrul discului impregnat cu extract (6 mm) aferent metodei de evidențiere a
43 activității antibacteriene (tehnica difuzimetrică cu discuri). Diametrele zonelor de inhibare a
44 creșterii (mm) de către extractul hidroalcoolic din pielită, în cazul soiului Fetească Neagră
45 cultivat în sistem ecologic, au variat în ordinea: (*Lactococcus sp./CCB1*, $0 \pm 0,5$) >
46 (*Lactobacillus sp./CCB5*, $15 \pm 0,41$) > (*Bacillus sp./CCB3*, $10 \pm 1,41$) = (*Bacillus sp./CCB4*,
47 $10 \pm 0,71$) = (*Leuconostoc sp./CCB7*, $10 \pm 0,82$) > (*Streptococcus sp./CCB6*, $9 \pm 0,82$).

RO 135101 B1

Diametrele zonelor de inhibare a creșterii (mm) de către extractul hidroalcoolic din sâmburi, în cazul soiului Fetească Neagră cultivat în sistem ecologic, au variat în ordinea: (*Lactococcus sp./CCB1*, $16 \pm 0,41$) > (*Streptococcus sp./CCB6*, $14 \pm 0,71$) > (*Bacillus sp./CCB3*, $10 \pm 0,82$) = (*Leuconostoc sp./CCB7*, $10 \pm 0,71$) > (*Bacillus sp./CCB4*, $8 \pm 0,82$) = (*Lactobacillus sp./CCB5*, $8 \pm 0,71$). Analiza comparativă a datelor evidențiază faptul că extractul hidroalcoolic obținut din sâmburi 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 pieleță, pentru aceleași tulpini testate) și un spectru relativ mai larg (activitate antibacteriană manifestată pentru toate cele șase tulpini bacteriene testate), comparativ cu extractul obținut din pieleță (fig. 3).

Valorile concentrației minime de inhibiție ale extractelor obținute din pieleța strugurilor au variat între 820 și 4300 $\mu\text{g/mL}$, evidențiind astfel activitatea antagonistă a extractelor față de creșterea majorității tulpinilor bacteriene testate. Valorile CMI ale extractelor obținute din sâmburii strugurilor au variat între 850 și 3600 $\mu\text{g/mL}$. Substanțele cu activitate antibacteriană (în raport cu tulpinile testate) au fost prezente cu precădere în sâmburii 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 sâmburi. Standardizarea extractelor hidroalcoolice obținute din pieleță și din sâmburii 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 derivate 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 -pinen/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 sâmburi. Extractele hidroalcoolice din pieleță și sâmburii 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.

RO 135101 B1

- 1 Evidențierea activității antimicrobiene a extractelor din struguri, coroborată cu activitatea
 - 3 antioxidantă a acestora, furnizează baza științifică necesară în vederea izolării și purificării
 - 5 unor compuși chimici bioactivi din extractele din struguri, compuși care ar putea fi utilizați,
 - 7 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.

RO 135101 B1

Revendicări

- | | |
|---|----------------|
| | 1 |
| 1. Cremă emolientă pentru ten uscat, caracterizată prin aceea că , este constituită dintr-un amestec de lanolină, alcool cetilic, lauril sulfat de sodiu, în care s-a înglobat în proporție de 7% (volum/masă), un extract vegetal hidroalcoolic obținut din pieleț sau sâmbure de struguri din cultură ecologică de <i>Vitis vinifera L.</i> , soiul Fetească Neagră. | 3
5 |
| 2. Cremă emolientă pentru ten uscat, conform revendicării 1, caracterizată prin aceea că , extractul din pieleț de struguri înglobat 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) și o activitate antioxidantă în domeniul 0,80-1,50 mg-EAA /mL (EEA = echivalent acid ascorbic). | 7
9
11 |
| 3. Cremă emolientă pentru ten uscat, conform revendicării 1, caracterizată prin aceea că , extractul din sâmbure de struguri înglobat 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) și o activitate antioxidantă în domeniul 10,00-12,50 mg-EAA /mL (EEA = echivalent acid ascorbic). | 13
15
17 |

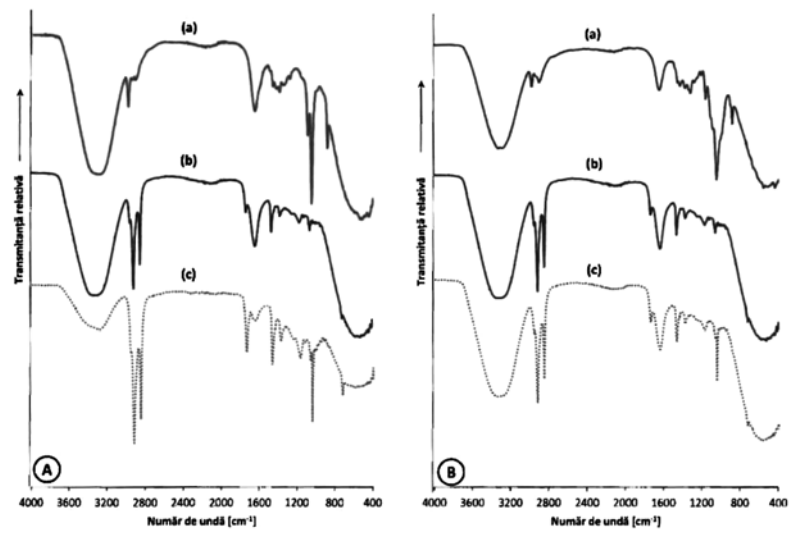


Fig. 1

(51) Int.Cl.

A61K 8/9783 (2017.01);

A61K 9/06 (2006.01)

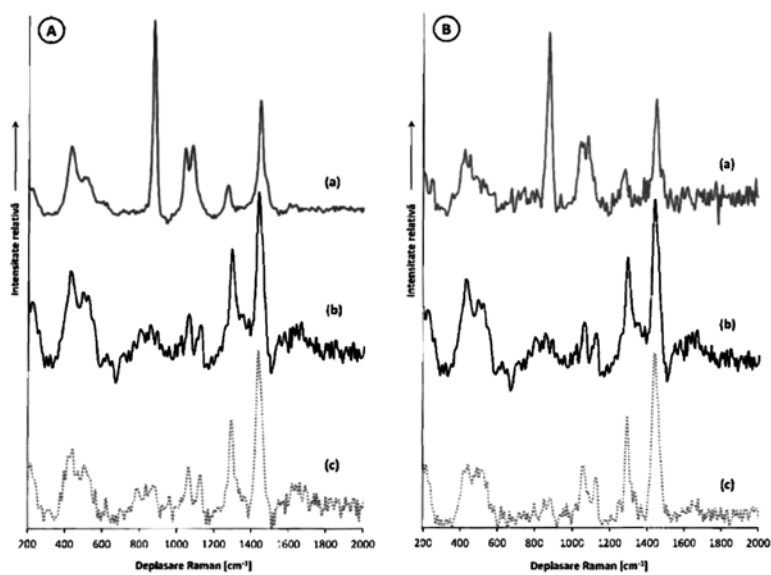


Fig. 2

(51) Int.Cl.

A61K 8/9783 (2017.01),

A61K 9/06 (2006.01)

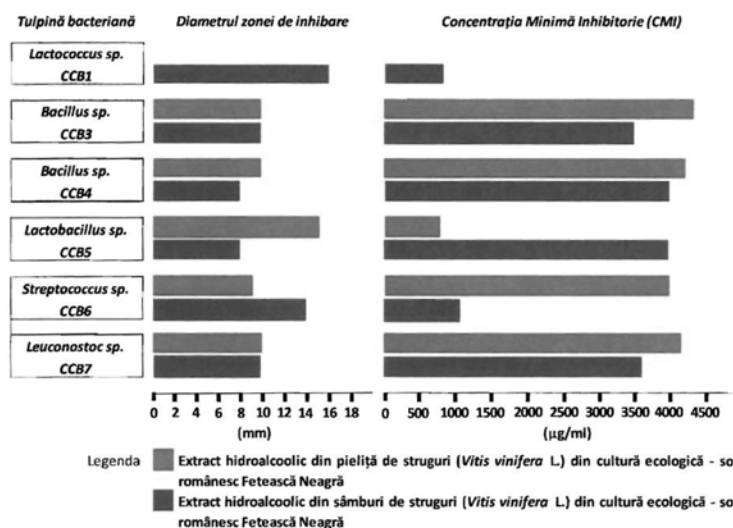


Fig. 3

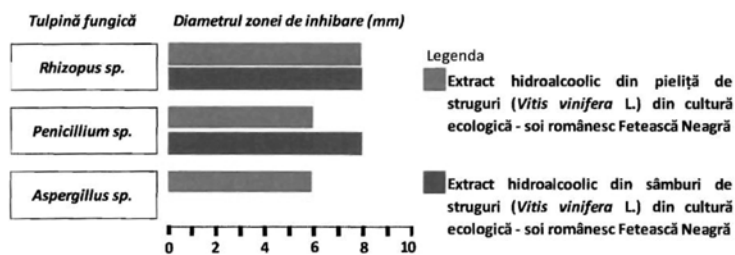


Fig. 4



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 502/2022