



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2023 00802

(22) Data de depozit: 06/12/2023

(41) Data publicării cererii:  
30/05/2024 BOPI nr. 5/2024

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
TEHNOLOGII CRIOGENICE ȘI IZOTOPICE,  
STR.UZINEI NR.4, RÂMNICU-VÂLCEA, VL,  
RO;  
• UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,  
ȘOS.PANDURI NR.90, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• GEANĂ ELISABETA-IRINA,  
ALEEA OLĂNEȘTI, NR.14, BL.A1, SC.A,  
AP.21, RÂMNICU VÂLCEA, VL, RO;

• CIUCURE CORINA TEODORA,  
STR.LUCIAN BLAGA, NR.8, BL.A42/1, SC.A,  
AP.16, RÂMNICU VÂLCEA, VL, RO;  
• MARINAȘ IOANA CRISTINA,  
STR.BOZIENI, NR.9, BL.830 BIS, SC.2,  
AP.64, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• STAN MIRUNA SILVIA, BD.LACUL TEI,  
NR.113, BL.6B, SC.2, ET.7, AP.64,  
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;  
• IONETE ROXANA ELENA,  
STR. LUCEAFĂRULUI NR. 6, BL. A2, SC. A,  
AP. 18, RÂMNICU VÂLCEA, VL, RO

(54) INGREDIENTE FUNCȚIONALE CU PROPRIETĂȚI  
ANTIOXIDANTE ȘI ANTIMICROBIENE OBȚINUTE  
DIN TESCOVINĂ DE STRUGURI ȘI PROCEDEU  
DE OBȚINERE A ACESTORA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor ingrediente funcționale polifenolice cu proprietăți antioxidante și antimicrobiene din subproduse solide de vinificație, și anume tescovina de struguri (*Vitis Vinifera* L.). Procedeeul, conform invenției, constă în următoarele etape:

- 1) extracția enzimatică a polifenolilor cu pectinază în soluție de acid citric pH 4,0;
- 2) extracția asistată de microunde în soluție hidroetanolică 50%;
- 3) recuperarea și purificarea extractului, rezultând extracte polifenolice solide, cu rol de ingredient funcțional, având un conținut total de polifenoli de

438,27...618,58 mg GAE/g extract, activitate antioxidantă de 5112,34...6908,30  $\mu\text{M TE/g}$  extract și o compoziție polifenolică reprezentată de procianidină B<sub>2</sub>, catechină, epicatechină, quercetină, kaempferol, acizi siringici și p-cumarici și oenină pentru extractul de tescovină din struguri roșii. Ingredientele funcționale polifenolice obținute prezintă activitate antimicrobiană asupra tulpinilor Gram pozitive (*S. aureus*, *E. faecalis*) și negative (*P. mirabilis*, *P. aeruginosa*), respectiv, biocompatibilitate cu linia celulară de keratinocite HaCaT.

Revendicări: 3  
Figuri: 10

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 invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. .... a 2023	802
Data depozit ..... 06-12-2023	

Descrierea brevetului de invenție:

## INGREDIENTE FUNCȚIONALE CU PROPRIETĂȚI ANTIOXIDANTE ȘI ANTIMICROBIENE OBTINUTE DIN TESCOVINĂ DE STRUGURI ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA

elaborat de:

**Eliabeta-Irina Geană, Ciucure Corina Teodora, Ioana Cristina Marinaș, Miruna-Silvia Stan,  
Roxana Elena Ionete**

### Descrierea invenției

Strugurii reprezintă unul dintre cele mai cultivate fructe din întreaga lume, aproximativ 80 % din recoltă fiind folosită în sectorul vinificației. Industria vinicolă generează o cantitate mare de reziduuri, în principal tescovină de struguri care este compusă din cojile, semințele și tulpinile rezultate în urma presării strugurilor în procesul de vinificație, însemnând ~ 20% în greutate din strugurii procesați. În general, tescovina de struguri fie este distilată pentru a produce diferite băuturi alcoolice, fie este utilizată ca și compost sau hrană pentru animale sau este aruncată ca deșeu natural [1]. Incinerarea sau depozitarea tescovinei de struguri pe terenuri poate să fie dăunătoare mediului, datorită compușilor fenolici care scad pH-ul tescovinei, ducând la acidifierea solurilor precum și creșterea rezistenței la degradarea biologică. Alte probleme de mediu includ poluarea apelor de suprafață și subterane, miros neplăcut, atragerea muștelor și a dăunătorilor care pot răspândi boli [2].

În timpul vinificației, polifenoli din struguri sunt transferați în vin, dar o proporție mare rămâne încă în subprodusele solide de vinificație, și astfel, tescovina de struguri reprezintă un produs secundar care conține numeroase produse cu valoare adăugată, cum ar fi polifenoli, pigmenti, taninuri, zaharuri nefermentate, alcool, etc. [3]. În procesul de obținere a vinului alb, sucule rezultat în urma presării strugurilor este supus fermentării, tescovina nefiind implicată în fermentație, ceea ce face ca tescovină rezultată să conțină mai multă pulpă și zahăr rezidual în comparație cu tescovină de vin roșu, dar și cantități importante de polifenoli care nu au fost extrași în vin. În schimb, la procesarea vinului roșu, strugurii sunt în întregime implicați în fermentație și astfel, sucule și tescovina sunt fermentate împreună, timp în care zaharurile sunt transformate în alcool sub acțiunea drojdiilor și cantități importante de polifenoli trec astfel în vinuri [4].

Cantitatea de tescovină generată în urma vinificației depinde de soiul de struguri și de procesul de presare, precum și de etapele de fermentație, în timp ce variabilitatea compușilor fenolici și randamentul de extracție al acestora din tescovină depind de soiul de struguri, maturitatea strugurilor, locația geografică, climă, starea solului și procesul tehnologic de vinificație [5]. Astfel, tescovina de struguri conține numeroși compuși polifenolici valoroși reținuți din cojile și semințele de struguri, printre care acizi fenolici, flavanoli, flavonoli, proantocianidine, antociani și stilbene, care prezintă numeroase activități biologice, cum ar fi activitățile antioxidante, antimicrobiene, antiinflamatorii, anticancerigene și de protecție cardiovasculară [6,7]. Prin urmare, consumul de polifenoli a fost asociat cu un risc redus de boli cronice, inclusiv boli cardiovasculare, neurodegenerative și cancer, de exemplu, cancerul de colon [8].

Majoritatea acestor polifenoli sunt reprezentați de către polifenolii din peretele celular, care sunt legați de polizaharide prin interacțiuni hidrofobe, legături de hidrogen și legături covalente, dar există și polifenoli care se găsesc în citoplasma celulară, în interiorul vacuolelor celulare sau asociați cu nucleul





celular. În timp ce polifenolii din pereții celulari pot fi recuperați prin extracții tradiționale solvent-solid, polifenolii din structurile insolubile precum vacuolele celulelor vegetale și straturile duble ale membranei celulare sunt mai strâns legați, nefiind accesibile solvenților, necesitând tehnici avansate de extracție [9].

Degradarea polizaharidelor peretelui celular, care elimină această barieră fizică și deschide celula, este un pas fundamental în îmbunătățirea eliberării de polifenoli din tescovina de struguri. Cercetările s-au concentrat pe utilizarea enzimelor de hidroliză a peretelui celular, cum ar fi celulazele, glucanaza și pectinazele, pentru a elibera polifenolii din vacuolele și membrana celulară, dar și pentru a hidroliza polifenolii în compuși fenolici cu greutate moleculară mică, crescând astfel disponibilitatea și bioactivitatea acestora [10].

Prezența compușilor bioactivi adaugă valoare tescovinei de struguri care poate fi transformată în compuși valoroși pentru industria cosmetică, nutraceutică, farmaceutică și alimentară, reducând astfel impactul asupra mediului legat de eliminarea deșeurilor [11]. Astfel, există un interes sporit pentru valorificarea extensivă a tescovinei de struguri pentru a obține coproduse de mare valoare, cum ar fi remedii naturale pentru sănătate, suplimente alimentare și ingrediente alimentare funcționale.

În ultimii ani, a existat un interes din ce în ce mai mare pentru utilizarea subproduselor bogate în polifenoli proveniți din industria vinului pentru a produce extracte și produse noi pentru menținerea sănătății umane [8]. Importanța polifenolilor face ca tescovina de struguri să fie de interes pentru industria alimentară, nutraceutică, farmaceutică și chimică. Astfel, tescovina de struguri poate fi folosită pentru obținerea unui număr mare de componente cu valoare adăugată precum acizi comestibili (acizi tartric, malic și citric), etanol, fibre alimentare, ulei de semințe de struguri și antioxidanți [12]. Ca atare, extracția polifenolilor din deșeurile provenite din practicile industriale tradiționale reprezintă o sursă atractivă, durabilă și rentabilă de obținere a unor extracte polifenolice de mare valoare, care ar putea fi folosite drept ingrediente funcționale care pot fi încorporate în alimente funcționale sau diferite produse cosmetice.

Recuperarea compușilor valoroși din deșeurile alimentare precum tescovina de struguri este o problemă emergentă în sectorul alimentar, recuperarea acestor compuși în modul cel mai adecvat și ecologic, tehnicile de extracție și capacitatea de maximizare a randamentului fără a compromite stabilitatea/calitatea produsului fiind o sarcină dificilă. Din această perspectivă, metodele sunt modificate pentru a recupera componentele bioactive din tescovina de struguri pe baza unei tehnologii mai rapide și „mai ecologice” [3].

Annual, cramele produc o cantitate mare de tescovină de struguri într-o perioadă scurtă de timp, de aceea procesarea tescovinei de struguri imediat după producerea vinului este considerată esențială. Datorită bioactivității ridicate, susceptibilitatea la degradarea enzimatică și sensibilitatea la degradarea termică, este necesară o conservare eficientă a tescovinei și un proces eficient de recuperare. Astfel, utilizarea unor procese simple de uscare și măcinare permit conservarea substanțelor fitochimice din tescovina de struguri [1]. Uscarea este printre metodele de conservare utilizate în mod obișnuit, deoarece inhibă creșterea microorganismelor și întârzie reacțiile chimice [7]. Cu toate acestea, compușii fenolici sunt substanțe sensibile la căldură, prin urmare temperaturile mai mici de 60 °C sunt considerate potrivite pentru pretratarea tescovinului de struguri pentru a-și păstra compușii bioactivi. De asemenea, uscarea tescovinei provoacă ruperea și distrugerea pereților celulari și, în consecință, se formează cavități mari și spații intercelulare care permit extragerea cu ușurință a substanțelor celulare [13]. Măcinarea tescovinei uscate înainte de extracția compușilor bioactivi asigură crearea unei suprafețe mai mari de contact între materialul supus extracției și solventul folosit pentru extracție, în acest fel fiind posibilă obținerea unor extracte cât mai bogate în compuși bioactivi.



Recuperarea compușilor bioactivi din tescovina de struguri se realizează de obicei prin extracție, pentru aceasta fiind utilizate diferite metode convenționale și neconvenționale [14]. Extracțiile convenționale cu solvenți precum extracția solid-lichid cu agitare mecanică, macerarea, extracția la reflux și extracția Soxhlet, folosind în general soluții etanolice sau metanolice ca solvenți, reprezintă cele mai răspândite tehnici utilizate la scară de laborator și industrială pentru extragerea compușilor bioactivi din materiale vegetale. Astfel de metode care folosesc temperaturi ridicate facilitează procesul de transfer de masă, dar consumă multă energie și o cantitate mare de solvenți, astfel reprezentând o problemă energetică și de mediu serioasă. Totodată, utilizarea acestor metode duce la degradarea compușilor termolabili precum polifenolii, datorită hidrolizei și oxidării acestora în timpul extracției.

În prezent, accentul s-a îndreptat către utilizarea tehnologiilor emergente care optimizează performanța extracțiilor folosind tehnici care implică mai puțină energie și timp, considerate metode de extracție neconvenționale. Dintre acestea, extracția asistată cu ultrasunete, extracția asistată cu microunde (MAE), extracția cu fluide supercritice (SFC), extracția enzimatică sunt metode de extracție care se concentrează pe diminuarea utilizării solvenților organici în procesele de extracție împreună cu alte beneficii precum intensificarea procesului de transfer de masă, creșterea cineticii și a randamentelor de extracție pentru a obține produse cu valoare adăugată mai mare, într-un timp mai scurt, cu capacitate de recuperare mai mare [11].

Pentru extracția polifenolilor din tescovina de struguri, drept solvent extractiv este folosit etanolul datorită prezenței sale naturale în vinuri, comportamentului său de siguranță și caracterului său ecologic, în comparație cu alți solvenți organici precum metanolul. În plus, caracteristicile fizico-chimice (punct de fierbere scăzut) fac operațiunile de recuperare a solvenților mai ușoare și cu un cost energetic mai mic [15].

Extracția asistată cu microunde (MAE) constă în aplicarea unui câmp magnetic și a unui câmp electric care oscilează perpendicular unul pe celălalt, având ca rezultat modificarea structurii celulei. Astfel, undele electromagnetice pătrund în materiale și interacționează cu grupurile polare, provocând generarea de căldură și favorizând astfel încălzirea atât a solidului, cât și a solventului. Încălzirea cu microunde se bazează pe conducerea ionică și rotația dipolului, care provoacă frecare și ciocniri între ioni și dipoli, favorizând pătrunderea solventului și astfel perturbarea structurii celulelor, ceea ce facilitează extracția compușilor bioactivi [11]. Pentru optimizarea procesului de extracție cu microunde în vederea obținerii unor extracte cu un conținut cât mai mare de polifenoli trebuie să se țină cont de parametrii de operare importanți, printre care puterea microundelor aplicate, temperatura de extracție, timpul de extracție, raportul solid/lichid [16].

Extracția asistată de enzime este o tehnică de extracție verde care nu utilizează solvenți organici toxici, în comparație cu extracția convențională cu solvenți, fiind considerată o metodă de extracție ecologică. Mecanismul activității enzimatică joacă un rol major în procesul de extracție asistată de enzime datorită selectivității sale și se bazează pe formarea complexului enzimă-substrat, care provoacă stres și încordare asupra substratului, ceea ce are ca rezultat promovarea reacțiilor hidrolitice. Eficiența extracției asistată de enzime depinde de capacitatea enzimei de a hidroliza peretele celular și de a perturba structura complexă a peretelui celular, cu eliberarea compușilor bioactivi [17]. Diferite enzime precum pectinaza, celuloza, hemiceluloza și glucozidaza s-au utilizat pentru a perturba peretele celular din diferite matrici vegetale, prin ruperea legăturilor glicozidice din lanțurile de polizaharide în mono și oligozaharide, și totodată eliberarea polifenolilor complecși din peretele celular dar și pentru a facilita accesul la polifenolii din citoplasma celulară, din interiorul vacuolelor celulare sau asociați cu nucleul celular, cu eliberarea acestora în solventul de extracție. Principalul avantaj al extracției asistată de enzime este că oferă o



abordare ecologică, nouă și sigură pentru extracția compușilor bioactivi și o selectivitate mare în comparație cu alte metode de extracție [18]. Extracția asistată de enzime a fost aplicată cu succes pentru extracția compușilor polifenolici din diferite matrice de plante, cum ar fi tescovina de măr, tescovina de struguri, produsele secundare obținute de la obținerea uleiului de măsline [19].

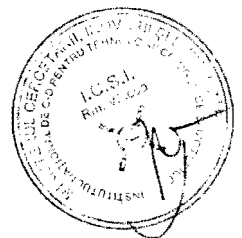
Un alt aspect important de luat în considerare este calitatea extractului. Îmbunătățirea extracției trebuie să fie în cantitate (randamentul procesului) și în calitate (conținutul de compuși bioactivi în produsul final). Metodele de extracție a compușilor fenolici din materiale vegetale sunt neselective și produc soluții polifenolice cu cantități mari de produse secundare nedorite, precum zaharuri, alcoolii, acizi organici, aminoacizi proteine și fibre, care depreciază extractul polifenolic și, de asemenea, interferează în biofuncționalitatea acestuia [5]. Aceste interacțiuni pot fi uneori pozitive, în timp ce în alte cazuri ele împiedică capacitatea antioxidantă a polifenolilor. Zaharurile, sunt capabile să încapsuleze polifenoli și să le livreze acolo unde capacitatea lor de a distruge radicalii liberi este mai utilă. De exemplu, zaharurile pot proteja polifenolii în stomac și intestinal subțire, cu eliberarea acestora în colon, creând un mediu de creștere antioxidant pozitiv pentru microflora [20]. Pe de altă parte, zaharurile, accelerează degradarea compușilor fenolici în timpul depozitării sau provoacă probleme în etapele ulterioare de prelucrare, cum ar fi uscarea prin pulverizare, împiedicând concentrarea extractelor. Adsorbția este o metodă eficientă de purificare a compușilor polifenolici din diferite extracte care permite separarea compușilor țintă prin diferența lor de polaritate față de compușii nepolari, cum ar fi carbohidrații, pentru aceasta folosindu-se diferite materiale adsorbante, printre care rășini polimerice, rășini schimbătoare de ioni și zeoliți [21,22].

Interesul tot mai mare pentru valorificarea completă a compușilor bioactivi din reziduurile vegetale procesate, a încurajat cercetările privind aplicarea enzimelor de hidroliză și a metodelor de extracție ecologice pentru eliberarea completă a compușilor fenolici din matricea vegetală cu obținerea unor coproduse de mare valoare care pot fi utilizate drept remedii naturale pentru sănătate, suplimente alimentare și ingrediente alimentare nutriționale. Prin urmare, există o piață de nișă promițătoare pentru utilizarea tescovinei de struguri pentru aplicații în industria alimentară și cosmetică, cum ar fi: obținerea de alimente funcționale îmbogățite cu fibre dietetice și polifenoli, obținerea unor conservanți și coloranți artificiali, obținerea unor suplimente alimentare care conțin extract de tescovină de struguri, cosmetice pe bază de ulei de semințe de struguri și extracte antioxidante care oferă o protecție a pielii și previn îmbătrânirea și alte afecțiuni ale pielii [12,23].

**Problema tehnică pe care o rezolvă această invenție** constă în faptul că propune o metodă de extracție eficientă și completă a polifenolilor din tescovina de struguri, prin combinarea a două metode de extracție, extracția enzimatică pentru punerea în libertate a polifenolilor care se găsesc în citoplasma celulară, în interiorul vacuolelor celulare sau asociați cu nucleul celular și extracția asistată de microunde pentru eliberarea polifenolilor din peretele celular.

**Soluția pe care o propune prezenta invenție** este obținerea unor extracte polifenolice cu activitate antioxidantă și antimicrobiană ridicată obținute din tescovină de struguri prin utilizarea secvențială a extracției enzimatică și a extracției asistată de microunde, urmată de purificarea extractelor pentru îndepărtarea zaharurilor. Extractele obținute sunt caracterizate și testate pentru utilizarea acestora ca ingrediente în vederea obținerii unor alimente funcționale, suplimente alimentare sau produse cosmetice, menite să mențină starea de sănătate a populației.

**Avantajele invenției:** Procedul de extracție propus pentru recuperarea compușilor polifenolici din tescovina de struguri îndeplinește termenii definiției procesului ecologic, deoarece utilizează solvenți alternativi (apă, etanol) și procedee de extracție prietenoase cu mediul (extracția asistată de enzime și



extracția asistată de microunde) pentru valorificarea unor produse naturale regenerabile (tescovina de struguri), furnizând extracte/ingredient polifenolice sigure și de înaltă calitate, cu proprietăți antioxidante și antimicrobiene ridicate.

#### Prezentarea pe scurt a figurilor și tabelelor

**Figura 1.** Schema de obținere a extractului/ingredientului polifenolic conform invenției

**Figura 2.** Cromatograma curentului ionic total (TIC) pentru extractul polifenolic din tescovina de struguri, în modul de ionizare negativ

**Figura 3.** Activitatea antimicrobiană pentru extractele etanolice obținute din tescovina de struguri roșii (A) și tescovina de struguri albi (B) la concentrații fixe

**Figura 4.** Biocompatibilitatea extractului din tescovina de struguri albi asupra liniei de keratinocite umane HaCaT evaluată prin metodele MTT (A) și cuantificarea eliberării de LDH extracelular LDH (B)

**Figura 5.** Biocompatibilitatea extractului din tescovina de struguri roșii asupra liniei de keratinocite umane HaCaT evaluată prin metodele MTT (A) și cuantificarea eliberării de LDH extracelular LDH (B)

**Tabelul 1.** Proprietățile bioactive ale extractului hidroetanolic din tescovina de struguri

**Tabelul 2.** Proprietățile bioactive ale extractelor/ingredientelor polifenolice din tescovina de struguri

**Tabelul 3.** Identificarea prin UHPLC-MS/MS și cuantificarea compușilor fenolici în extractele/ingredientele polifenolice din tescovina de struguri albi (TSA) și roșii (TSR)

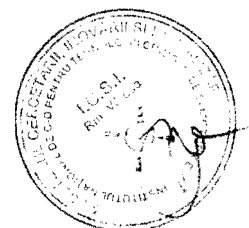
**Tabelul 4.** Activitatea antimicrobiană a extractelor etanolice din tescovina de struguri.

#### Prezentarea în detaliu a unui exemplu de realizare al invenției, cu referire la figuri

Materia primă utilizată este reprezentată de tescovină de struguri albi, soiul Chardonnay, și tescovină de struguri roșii, soiul Cabernet Sauvignon, ambele obținute de la o cramă localizată în regiunea Olteniei.

Pentru hidroliza enzimatică a tescovinei de struguri s-a utilizat enzima Pectinex® Ultra Clear care este o enzimă folosită în vinificație încă din anii 1960 cu scopul de a descompune strugurii presaiți, facilitând astfel extracția polifenolilor în vin și totodată pentru limpezirea vinului prin îndepărtarea pectinei. Pentru aceasta, tescovina de struguri deshidratată și marunțită este suspendată în soluție de acid citric pH = 4,0 la un raport solid:lichid = 1:7,5 (g/v), după care se adaugă 50 μL enzima/gram tescovină, iar suspensia obținută se omogenizează cu agitare mecanică timp de 20 ore la o temperatură de 35 °C. Condițiile de hidroliză selectate (pH 4,0 și 35 °C) s-au bazat pe evaluări ale curbelor de temperatură și pH ale activității enzimelor, așa cum sunt date în fișele de date ale furnizorilor de enzime.

Dupa extracția/hidroliza enzimatică, suspensia rezultată este supusă extracției cu solvenți asistată de microunde folosind un sistem de extracție cu microunde din oțel inoxidabil, construcție robustă, pentru aplicații de laborator, prevăzut cu unitate de microunde de 1900 W care asigură un câmp de microunde omogen, senzor de temperatură cu infraroșu pentru controlul temperaturii, fără contact cu proba, și agitator magnetic integrat pentru omogenizarea amestecului de extracție. Condițiile experimentale ale metodei de extracție asistată de microunde în soluție hidroetanolică 50% au fost optimizate în vederea obținerii unui conținut cât mai mare de polifenoli prin utilizarea metodei suprafeței de răspuns. Astfel, parametrii experimentali optimi constau în: raportul solid lichid 1/15 (g/v), la o putere a microundelor de 1000 W, aplicată timp de 35 min., la o temperatură de 60 °C. La finalul programului de extracție asistată de



microunde, amestecul de extracție se răcește la temperatura camerei, după care se centrifughează la 5000 rpm, timp de 10 min. Supernatantul rezultat se colectează, după care se îndepărtează etanolul folosind un rotoevaporator rotativ cu vid, la 50 °C.

Extractul apos rezultat este purificat în vederea îndepărtării zaharurilor folosind un adsorbent de tip Amberlite XAD-2 deșus într-o coloană de sticlă la un raport de 50 g adsorbant /50 mL extract apos acidulat la pH = 2,0. După aplicarea extractului apos pe stratul de adsorbent, adsorbentul care a reținut polifenolii se spală cu apă acidulată la pH = 2 și apă până la îndepărtarea completă a zaharurilor. Verificarea îndepărtării zaharurilor se realizează prin testarea fracțiilor de spălare prin metoda spectrofotometrică de determinare a zaharurilor reducătoare. Eluarea polifenolilor reținuți pe adsorbent s-a realizat cu 200 mL etanol acidulat cu 0,01% acid trifluoroacetic. Extractul polifenolic obținut este concentrat folosind un rotoevaporator rotativ cu vid, la 40 °C, prevăzut cu un curent de azot, până la uscare. Reprezentarea schematică a etapelor necesare pentru obținerea extractelor polifenolice din tescovina de struguri, conform procedurii de extracție și purificare propus în invenție, este prezentată în Figura 1.

Ingredientele funcționale (extracte polifenolice solide) obținute conform metodei de extracție și purificare descrise anterior au demonstrat randamente de extracție a polifenolilor ridicate, anume: 1550 mg extract polifenolic/100 g tescovină de struguri albi, soiul Chardonnay, respectiv 3150 mg extract/100 g tescovină de struguri roșii, soiul Cabernet Sauvignon, valorile fiind mai mari comparativ cu datele din literatură (2079,33 mg/100 g de tescovină uscată de struguri Cabernet) [24].

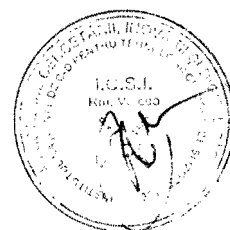
Ingredientele funcționale obținute conform invenției au fost caracterizate din punct de vedere al conținutului total de polifenoli (TP), conținutul total de flavonoizi (TF), activitatea antioxidantă (TEAC, FRAP, CUPRAC, DPPH), profilul polifenolilor prin UHPLC-MS/MS, activitate antimicrobiană, toxicitate și biocompatibilitate.

**Conținutul total de polifenoli (TP)** a fost măsurat spectrofotometric conform metodei descrisă de Singleton și Rossi (1965) cu unele modificări [25]. Peste 100  $\mu$ L extract dizolvat sau soluție standard de acid galic s-au adăugat 5 mL apă distilată și 200  $\mu$ L reactiv Folin Ciocâlțeu, după care se omogenizează. După 5 minute de reacție, s-au adăugat 300  $\mu$ L de soluție de carbonat de sodiu 20% pentru a opri reacția și se lasă timp de 2 ore, la temperatura camerei și ferit de lumină, pentru a dezvolta culoarea albastră caracteristică. După incubare la temperatura camerei, timp de 2 ore, s-au înregistrat valorile absorbanțelor la 675 nm, față de apă. Curba de calibrare s-a realizat pentru concentrații de acid galic (GAE) cuprinse între 0-1250 mg/L, iar rezultatele s-au exprimat în mg GAE/g extract).

**Conținutul total de flavonoide (TF)** a fost determinat prin metoda clorurii de aluminiu, conform protocolului descris de Geană și colab. [26], ce constă în tratarea a 0,5 mL extract dizolvat/standard cu 0,4 mL soluție de  $AlCl_3$  25 g/L, 0,5 mL soluție de acetat de sodiu 100g/L și 4 mL apă. După agitare această soluție a fost lăsată să stea timp de 15 minute la întuneric și s-a citit absorbanta amestecului la lungimea de undă,  $\lambda = 430$  nm, față de apă. Curba de calibrare s-a realizat pentru concentrații de quercetin (QE) în intervalul 0-125 mg/L, iar conținutul în flavonoide a fost exprimat în mg QE/g extract.

#### Activitatea antioxidantă

**DPPH:** Activitatea antioxidantă a extractelor polifenolice obținute s-a determinat prin metoda de captură a radicalilor DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), urmând procedura descrisă de Geana și colab. [26]. Pentru aceasta, 6 ml de soluție metanolică DPPH 0,09 mg/ml au fost amestecați cu alicote de 0,5 ml de extract diluat, iar absorbanta a fost măsurată la 517 nm, față de metanol ca martor, după 20 minute, la temperatura camerei. Măsurătorile de absorbție sunt transformate în activitate antioxidantă utilizând



Trolox drept standard, în intervalul de concentrație de 50-1000  $\mu\text{mol/L}$ , iar activitatea antioxidantă a extractului a fost exprimată ca echivalenți Trolox  $\mu\text{mol TE/g extract}$ .

**TEAC:** Metoda antioxidantă de neutralizare a radicalului ABTS a fost determinată prin testul de decolorare a cationilor radicalici ABTS.  $\text{ABTS}^+$  a fost produs prin reacția dintre 7 mM ABTS în apă și 2,45 mM persulfat de potasiu concentrație finală, depozitat la întuneric la temperatura camerei, timp de 12-16 ore înainte de utilizare [27]. Soluția  $\text{ABTS}^+$  a fost apoi diluată cu metanol până la o absorbantă de apox. 0,700 la 734 nm. După adăugarea a 20  $\mu\text{L}$  de probă în 180  $\mu\text{L}$  de soluție  $\text{ABTS}^+$  diluată, absorbanta a fost măsurată după 30 min. Măsurătorile s-au realizat în triplicat. Trolox a fost folosit ca substanță standard, curba de calibrare fiind realizată pentru intervalul de concentrații 12,5-150  $\mu\text{M}$ , pornind de la o soluție stoc de Trolox 1 mM.

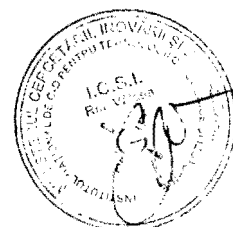
**FRAP:** Metoda FRAP se bazează pe abilitatea antioxidantilor de a reduce complexul tripiridiltriazină –  $\text{Fe}^{3+}$  (Fe(III)-TPTZ) la complexul tripiridiltriazină –  $\text{Fe}^{2+}$  (Fe(II)-TPTZ) de colorație albastră, având ca mecanism de reacție cedarea de electroni de către antioxidant. Determinarea puterii antioxidante de reducere a fierului s-a realizat prin metoda descrisă în literatură, cu unele modificări [28,29]. S-au preparat următoarele soluții: tampon acetat de 300 mM, pH 3,6; soluția stoc de 10 mM TPTZ în 40 mM HCl; și soluția de 20 mM  $\text{FeCl}_3$  în apă. Se prepară reactivul FRAP prin amestecarea a 10 părți de soluție tampon acid acetic – acetat de sodiu 300 mM, pH 3,6 cu o parte soluție TPTZ 10 mM și o parte soluție de  $\text{FeCl}_3$  20 mM (10:1:1). Reactivul FRAP este preparat zilnic (cu excepția soluției tampon) și ținut pe baie de apă la 37 °C. La 15  $\mu\text{L}$  probă/ soluția standard, 285  $\mu\text{L}$  reactiv FRAP și se incubează timp de 30 minute la 37 °C la întuneric. După incubare se citește absorbanta la  $\lambda = 593 \text{ nm}$ . Trolox a fost folosit ca substanță standard, curba de calibrare fiind trasată pentru intervalul de concentrații 10 - 250  $\mu\text{M}$  Trolox/mL, pornind de la o soluție stoc de Trolox 1 mM.

**CUPRAC:** Determinarea activității antioxidante prin metoda CUPRAC se bazează pe reducerea complexului cupric, neocuproină (Cu (II)-Nc) de către antioxidanți în formă cuproasă (Cu (I)-Nc). Reducerea ionului cupric s-a realizat conform unei metode adaptate după [30], astfel: s-au amestecat 60  $\mu\text{L}$  de probă/soluții standard cu 50  $\mu\text{L}$   $\text{CuCl}_2$  (10 mM), neocuproină 50  $\mu\text{L}$  (7,5 mM) și acetat de amoniu 1M, pH=7 (50  $\mu\text{L}$ ). După 30 de minute, absorbanta a fost măsurată la 450 nm. Curba de calibrare s-a realizat față de Trolox, într-un intervalul de concentrații cuprins între 50 - 1500  $\mu\text{M}$  Trolox/mL, pornind de la o soluție stoc de Trolox 2 mM.

Proprietățile bioactive (total polifenoli, total flavonoizi și activitatea antioxidantă) au fost exprimate atât pentru soluțiile hidroetanolice, înainte de purificarea pe adsorbent (Tabel 1), cât și pentru extractele/ingredientele polifenolice sub formă de pulbere (Tabel 2).

Extractele hidroetanolice din tescovina de struguri obținute conform procedurii descris în invenție au prezentat proprietăți bioactive semnificative, cu valori mai mari pentru extractul din tescovina de struguri roșii comparativ cu cel din tescovina de struguri albi (Tabel 1). Astfel, conținutul total de polifenoli a fost de 2115,36 mg GAE/L pentru extractul din tescovina de struguri roșii și de 3950,52 mg GAE/L pentru extractul din tescovina de struguri albi, în timp ce conținutul de flavonoizi a fost de 53,80 mg QE/L pentru extractul din tescovina de struguri roșii și de 87,21 mg QE/L pentru extractul din tescovina de struguri albi. Activitatea antioxidantă a extractului hidroetanolic din tescovina de struguri roșii a fost de aproximativ două ori mai mare comparativ cu extractul din tescovina de struguri albi.

Extractele din tescovina de struguri au prezentat proprietăți bioactive semnificativ mai mari comparativ cu datele prezentate în literatura de specialitate, unde rezultatele sunt raportate față de tescovina uscată. Rezultatele determinărilor proprietăților bioactive (total polifenoli, total flavonoizi, activitate





antioxidantă) ale extractelor din tescovina de struguri obținute conform procedurii descris în invenție sunt prezentate în Tabelul 2. Astfel, conținutul total de polifenoli în extractul obținut din tescovina de struguri albi a fost de 438,27 mg GAE/g extract, iar în extractul obținut din tescovina de struguri roșii a fost de 618,58 mg GAE/g. Conținutul de flavonoizi totali în extractul din tescovina de struguri albi a fost de 19,78 mg QE/g extract, iar în extractul din tescovina de struguri roșii de 51,39 QE/g extract. Activitatea antioxidantă a extractelor din tescovina de struguri a fost de 5112,34  $\mu\text{M TE/g}$  extract pentru extractul din tescovina de struguri albi și de 6908,30  $\mu\text{M TE/g}$  extract pentru extractul din tescovina de struguri roșii.

În literatura de specialitate sunt raportate valori ale conținutului de polifenoli totali de 17,06 mg GAE/g [31], 41,23 mg GAE/g [32], 4,27-20,79 mg GAE/g [24] pentru tescovina de struguri roșii, în timp ce pentru tescovina de struguri albi, valorile conținutului de polifenoli totali sunt de 25,58 mg GAE/g [31], 44,70 mg GAE/g [32]. De asemenea, conținutul total de polifenoli în extractele obținute din tescovina de struguri conform invenției este mult mai mare comparativ cu valorile din literatură pentru extractele obținute prin diferite metode de extracție și purificare, cu valori de 22,61-49,92 mg GAE/g extract [33], 50,01-207,06 mg GAE/g extract [34] sau 2,60 mg GAE/g extract [35].

Activitatea antioxidantă raportată în literatură pentru tescovina de struguri prezintă valori cuprinse între 41,66-85,13  $\mu\text{mol TE/g}$  [31], 88,88-138,24 mg TE/g [32], valorile activității antioxidante ale extractelor din tescovina de struguri obținute conform invenției fiind mult mai mari.

**Profilul UHPLC-MS/MS al extractelor polifenolice din tescovina de struguri** s-a realizat prin UHPLC-MS/MS cu ionizare ESI, folosind un spectrometru de masă de înaltă rezoluție Q Exactive<sup>TM</sup> Focus Hybrid Quadrupole-Orbitrap (ThermoFisher Scientific) echipat cu HESI, cuplat la un cromatograf de lichide de înaltă performanță UltiMate 3000 UHPLC (ThermoFisher Scientific). Separarea cromatografică s-a realizat pe o coloană Kinetex® C18 (100  $\times$  2.1 mm, diametrul particulelor de 1.7  $\mu\text{m}$ ), la o temperatură de 30  $^{\circ}\text{C}$ . Faza mobilă: A – apă cu 0,1% acid formic și B – metanol cu 0,1% acid formic, eluția în gradient la un debit cuprins între 0,3-0,4 mL/min. Spectrul de masă s-a înregistrat în modul de ionizare negativă într-un domeniu cuprins între 75-1000 m/z, la o rezoluție de 70.000. Azotul a fost folosit ca gaz de coliziune și gaz auxiliar la un debit de 11 și respectiv 48 unități arbitrare. Tensiunea aplicată a fost de la 2,5 kV și temperatura capilară a fost de 320  $^{\circ}\text{C}$ . Energia celulei de coliziune a fost de 30 eV. Datele au fost achiziționate și procesate folosind pachetul software Xcalibur (Versiunea 4.1). Calibrarea s-a realizat în intervalul de concentrație 50-2000  $\mu\text{g/L}$  pentru fiecare dintre compușii fenolici individuali (acizi fenolici, flavonoizi, stilbeni, antocianidine), prin diluarea în serie cu metanol a amestecului standard de concentrație 10 mg/L.

Cromatograma UHPLC-MS/MS a curentului ionic total (TIC) pentru extractul din tescovina de struguri, în modul de ionizare negativ, acoperind un interval de scanare între 75 și 1000 m/z, este prezentată în Figura 2. Identificarea compușilor fenolici în extractele din tescovina de struguri, timpul de retenție, valorile m/z ale ionilor aduct și fragmentele MS/MS în modul ESI negativ, precum și rezultatele cantitative în extractele obținute din tescovina de struguri, conform procedurii descris în invenție, sunt prezentate în Tabelul 3. Astfel, în extractele din tescovina de struguri au fost cuantificați o serie de compuși polifenolici din clasa acizilor fenolici, flavonoizilor, stilbenilor, antocianilor, compuși care prezintă proprietăți antioxidante, antiinflamatorii, antimicrobiene, etc.

Extractul/ingredientul polifenolic obținut din tescovina de struguri albi (TSA) conține cantități importante de compuși polifenolici, și anume: procianidin B2 (916,53  $\mu\text{g/g}$ ), catechină (377,35  $\mu\text{g/g}$ ), epicatechină (247,01  $\mu\text{g/g}$ ), quercetin (366,98  $\mu\text{g/g}$ ), kaempferol (435,10  $\mu\text{g/g}$ ), acid siringic (115,13  $\mu\text{g/g}$ ), taxifolin (89,38  $\mu\text{g/g}$ ), acid abietic (76,95  $\mu\text{g/g}$ ), acid ferulin (61.66  $\mu\text{g/g}$ ), acid 4-hidroxibenzoic



(37,95 µg/g), acid elagic (36,42 µg/g), acid shikimic (28,90 µg/g), acid abscisic (25,07 µg/g), isorapontigenin (26,83 µg/g).

Extractul/ingredientul polifenolic obținut din tescovina de struguri roșii (TSR) conține cantități importante de compuși polifenolici, și anume: procianidin B2 (1426,54 µg/g), oenină (833,58 µg/g), acid siringic (790,92 µg/g), catechină (448,83 µg/g), epicatechină (375,65 µg/g), acid p-cumaric (287,56 µg/g), quercetin (366,98 µg/g), acid cafeic (131,98 µg/g), acid vanilic (113,39 µg/g), acid ferulic (33,58 µg/g), isorhamnetin (36,37 µg/g), isorapontigenin (54,99 µg/g).

Datorită conținutului ridicat de polifenoli ce conferă extractelor/ingredientelor polifenolice obținute conform invenției un caracter puternic antioxidant, acestea pot fi folosite pentru obținerea unor suplimente alimentare sau alimente funcționale puternic antioxidante menite să mențină starea de sănătate a populației.

#### Activitatea antimicrobiană

**Tulpini microbiene:** Activitatea antimicrobiană a fost testată asupra bacteriilor Gram-pozitive (*Staphylococcus aureus* ATCC, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433) și Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosacens* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 29245), precum și levuri (*Candida albicans* ATCC 10231).

**Evaluarea cantitativa a activității antimicrobiene:** Analiza cantitativă a fost efectuată utilizând metoda microdiluțiilor binare în mediu lichid (Tryptone Soy Broth pentru bacterii și Sabouraud pentru levuri). Intervalul de concentrație pentru extractele alcoolice a fost de la 7,81 la 500 µL/mL. Simultan, s-au făcut diluții în serie cu etanol 50% în condiții similare de lucru pentru a obține un control negativ. Fiecare godeu a fost inoculat cu 10 µL suspensie microbiană proaspătă de 24h, ajustată la  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL. Valorile concentrațiilor minime inhibitorii (CMI) au fost stabilite atât macroscopic, ca ultimă concentrație la care nu s-a observat creșterea microbiană, cât și spectrofotometric. Absorbanța culturilor microbiene a fost măsurată la 620 nm utilizând spectrofotometrul FlexStation 3 UV-Vis (Molecular Devices, San Jose, CA, SUA). Din godeurile unde nu se observă creștere microbiană s-au spotat câte 5 µL pe mediu solid Muller Hilton în vederea determinării concentrației minime microbicide (CMB).

**Evaluarea influenței asupra aderenței microbiene:** Influența asupra capacității de aderență la substrat inert a fost cuantificată după efectuarea protocolului analizei cantitative a efectului antimicrobian. Prin metoda microtitrării s-a evaluat biomasa aderată la nivelul godeurilor plăcilor din polipropilena după spălarea cu AFS, fixare cu metanol rece (10 min) și colorare cu cristal violet (concentrație 0,1%, timp de colorare 15 min). Densitatea optică a materialului biologic aderat și resuspendat în acid acetic (CH<sub>3</sub>COOH 33%, 15 min) s-a determinat prin citirea absorbantei la 490 nm.

Rezultatele determinărilor au indicat faptul că extractele din tesconina de struguri au prezentat activitate antimicrobiană mai bună asupra tulpinilor Gram negative (Tabel 4). Prin comparație cu activitatea solventului, activitatea antimicrobiană a extractului de tescovină de struguri albi s-a manifestat asupra tulpinilor *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* și *C. albicans*. Prin comparație cu solventul utilizat, extractul din tescovina de struguri roșii a prezentat activitate asupra tulpinilor *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. mirabilis* și *P. aeruginosa*.

Efectul microbicid s-a manifestat pentru extractul de tescovină de struguri albi și struguri roșii în cazul tulpinilor *S. aureus* și *S. epidermidis*; extractul de struguri albi asupra *E. faecalis*; extractul de tescovină din struguri albi s-a dovedit activ asupra tulpinii *E. coli*. Inhibarea aderenței microbiene s-a observat doar pentru două variante și anume tescovina de struguri albi asupra *S. aureus* și *E. faecalis*. Importanța inhibării aderenței microbiene constă în reducerea primei etape de formare a biofilmelor microbiene.



Pentru a evalua diferențele dintre extractele de tescovină și solvent (etanol 50%), s-a calculat viabilitatea microbiană la concentrații fixe. În cazul tescovinei de struguri rosii, viabilitatea microbiană (%) a fost semnificativ mai scăzută față de solventul utilizat asupra tulpinilor *S. aureus* ( $p < 0.0001$ ), *E. faecalis* ( $p < 0.0001$ ), *P. mirabilis* ( $p < 0.0001$ ), *P. aeruginosa* ( $p < 0.01$ ) și *C. albicans* ( $p < 0.05$ ). S-a observat o creștere a proliferării semnificativă față de solventul utilizat pentru tulpina *S. epidermidis* ( $p < 0.01$ ) și nesemnificativă față de *E. coli* ( $p > 0.05$ ), probabil datorită protecției oxidative generată de antioxidanții din extract (Figura 3A). Evaluarea diferențelor dintre extractul obținut din tescovina de struguri albi față de solventul utilizat, indică faptul că extractul a scăzut semnificativ viabilitatea microbiană la concentrațiile similare de solvent în special asupra tulpinilor *S. aureus* ( $p < 0.0001$ ), *E. faecalis* ( $p < 0.0001$ ), *P. mirabilis* ( $p < 0.01$ ), *P. aeruginosa* ( $p < 0.0001$ ) și *C. albicans* ( $p < 0.001$ ) (Figura 3B).

Raportat la literatura de specialitate s-a observat o îmbunătățire a activității antimicrobiene a extractelor din tescovina de struguri obținute conform invenției asupra tulpinilor *C. albicans*, *S. aureus* [36], *epidermidis* [37], *E. coli* [38], *P. aeruginosa* [39], fiind mai active asupra bacteriilor Gram negative.

#### **Biocompatibilitatea s-a determinat prin metodele MTT și LDH**

**Testul MTT** este o metodă cantitativă pentru analiza viabilității celulare. Keratinocitele HaCaT au fost co-cultivate timp de 24 de ore cu diferite concentrații din fiecare extract (50-500  $\mu\text{L/mL}$ ) și incubate în continuare cu 1 mg/mL [3- (4,5-dimetiltiazolil)] - 2,5 difeniltetrazolium bromură soluție (MTT) la întuneric, la 37 °C. După 4 ore de incubare, cristalele de formazan au fost solubilizate cu izopropanol, rezultând o soluție purpurie, cuantificată spectrofotometric la 550 nm, utilizând FlexStation3 (Molecular Devices, SUA).

Nivelul de citotoxicitate exercitat asupra celulelor HaCaT a fost identificat folosind kit-ul Cytotoxicity Detection Kit PLUS (Roche, NY, USA), urmând instrucțiunile producătorului. Mediul de cultură a fost colectat și amestecat cu componentele kitului pentru a fi analizată eliberarea extracelulară a LDH prin măsurare spectrofotometrică a absorbanțelor la 490 nm.

Practic, extractele/ingredientele obținute conform invenției prezintă viabilitate de aprox. 100% raportat la martorul de viabilitate celulară, în timp ce față de concentrația similară de etanol a crescut semnificativ viabilitatea la toate concentrațiile luate în lucru. Ratele ridicate de viabilitate celulară în contact cu extractul din tescovină de struguri albi a demonstrat că sunt biocompatibile cu linia de keratinocite HaCaT (Figura 4A). O creștere semnificativă a viabilității celulare pentru celulele tratate cu extractul de tescovină de struguri albi față de concentrația similară de solvent s-a observat la toate concentrațiile prin metoda MTT, unde extractul clasic a crescut semnificativ proliferarea celulară (Figura 4A). Mai mult, caracterul antioxidant a condus la scăderea semnificativă a secreției de LDH extracelular atât față de martorul de celule viabile cât și concentrația similară de solvent (Figura 4B).

Extractul din tescovină de struguri roșii s-a dovedit biocompatibil atât prin metoda MTT cât și eliberarea de LDH. S-a observat prin MTT că datorită caracterului antioxidant al extractului crește semnificativ viabilitatea celulară comparativ cu concentrația similară de solvent (Figura 5A), însă prin metoda de cuantificare a eliberării de LDH s-a observat o creștere semnificativă față de martorul de celule viabile ( $p < 0,05$ ), probabil datorită concentrației de antociani care interferează la lungimea de undă 490 nm (Figura 5B).

Datorită faptului că extractele/ingredientele funcționale obținute conform invenției au prezentat biocompatibile cu linia celulară de keratinocite HaCaT, observându-se o scădere semnificativă a eliberării LDH extracelular, indică faptul că acestea pot fi utilizate pentru obținerea unor produse cosmetice bogate în antioxidanți.



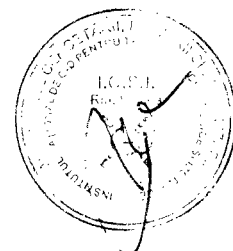


**Bibliografie**

1. Balli, D.; Cecchi, L.; Innocenti, M.; Bellumori, M.; Mulinacci, N., *Food Chemistry* **2021**, 355, 129642, doi:10.1016/j.foodchem.2021.129642.
2. Ahmad, B.; Yadav, V.; Yadav, A.; Rahman, M.U.; Yuan, W.Z.; Li, Z.; Wang, X. I., *Science of The Total Environment* **2020**, 719, 137315, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137315.
3. Ilyas, T.; Chowdhary, P.; Chaurasia, D.; Gnansounou, E.; Pandey, A.; Chaturvedi, P., *Environmental Technology & Innovation* **2021**, 23, 101592, doi:10.1016/j.eti.2021.101592.
4. Mendes, J.A.S.; Xavier, A.M.R.B.; Evtuguin, D.V.; Lopes, L.P.C., *Industrial Crops and Products* **2013**, 49, 286–291, doi:10.1016/j.indcrop.2013.05.003.
5. Drevelegka, I.; Goula, A.M., *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification* **2020**, 149, 107845, doi:10.1016/j.cep.2020.107845.
6. Brezoiu, A.M.; Matei, C.; Deaconu, M.; Stanciuc, A.M.; Trifan, A.; Gaspar-Pintiliescu, A.; Berger, D., *Food and Chemical Toxicology* **2019**, 133, 110787, doi:10.1016/J.FCT.2019.110787.
7. Drosou, C.; Kyriakopoulou, K.; Bimpilas, A.; Tsimogiannis, D.; Krokida, M., *Industrial Crops and Products* **2015**, 75, 141–149, doi:10.1016/j.indcrop.2015.05.063.
8. Jara-Palacios, M.J.; Hernanz, D.; Cifuentes-Gomez, T.; Escudero-Gilete, M.L.; Heredia, F.J.; Spencer, J.P.E., *Food Chemistry* **2015**, 183, 78–82, doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.022.
9. Medina-Meza, I.G.; Barbosa-Cánovas, G.V., *Journal of Food Engineering* **2015**, 166, 268–275, doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.06.012.
10. Chamorro, S.; Viveros, A.; Alvarez, I.; Vega, E.; Brenes, A., *Food Chemistry* **2012**, 133, 308–314, doi:10.1016/j.foodchem.2012.01.031.
11. Caldas, T.W.; Mazza, K.E.L.; Teles, A.S.C.; Mattos, G.N.; Brígida, A.I.S.; Conte-Junior, C.A.; Borguini, R.G.; Godoy, R.L.O.; Cabral, L.M.C.; Tonon, R.V., *Industrial Crops and Products* **2018**, 111, 86–91, doi:10.1016/j.indcrop.2017.10.012.
12. Beres, C.; Costa, G.N.S.; Cabezudo, I.; da Silva-James, N.K.; Teles, A.S.C.; Cruz, A.P.G.; Mellinger-Silva, C.; Tonon, R.V.; Cabral, L.M.C.; Freitas, S.P., *Waste Management* **2017**, 68, 581–594, doi:10.1016/j.wasman.2017.07.017.
13. Goula, A.M.; Thymiatis, K.; Kaderides, K., *Food and Bioproducts Processing* **2016**, 100, 132–144, doi:10.1016/j.fbp.2016.06.016.
14. Putnik, P.; Barba, F.J.; Lucini, L.; Rocchetti, G.; Montesano, D., *Food Research International* **2019**, 123, 516–517, doi:10.1016/j.foodres.2019.05.010.
15. Tournour, H.H.; Segundo, M.A.; Magalhães, L.M.; Barreiros, L.; Queiroz, J.; Cunha, L.M., *Industrial Crops and Products* **2015**, 74, 397–406, doi:10.1016/j.indcrop.2015.05.055.
16. Rodrigues, R.P.; Sousa, A.M.; Gando-Ferreira, L.M.; Quina, M.J., *Molecules* **2023**, 28, 2715, doi:10.3390/molecules28062715.
17. Cascaes Teles, A.S.; Hidalgo Chávez, D.W.; Zarur Coelho, M.A.; Rosenthal, A.; Fortes Gottschalk, L.M.; Tonon, R.V., *Journal of Food Engineering* **2021**, 288, 110128, doi:10.1016/j.jfoodeng.2020.110128.
18. Bautista-Expósito, S.; Tomé-Sánchez, I.; Martín-Diana, A.B.; Frias, J.; Peñas, E.; Rico, D.; Casas, M.J.G.; Martínez-Villaluenga, C., *Antioxidants* **2020**, 9, 984, doi:10.3390/antiox9100984.
19. Streimikyte, P.; Viskelis, P.; Viskelis, J., *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, 23, 2359, doi:10.3390/ijms23042359.
20. Álvarez, A.; Poejo, J.; Matias, A.A.; Duarte, C.M.M.; Cocero, M.J.; Mato, R.B., *Food and Bioproducts Processing* **2017**, 106, 162–170, doi:10.1016/j.fbp.2017.09.007.
21. Kammerer, D.; Gajdos Kljusuric, J.; Carle, R.; Schieber, A., *Eur Food Res Technol* **2005**, 220, 431–437, doi:10.1007/s00217-004-1078-z.

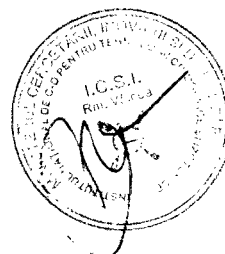


22. Zagklis, D.P.; Paraskeva, C.A., *Separation and Purification Technology* **2015**, *156*, 328–335, doi:10.1016/j.seppur.2015.10.019.
23. Antonić, B.; Jančíková, S.; Dordević, D.; Tremlová, B. G., *Foods* **2020**, *9*, 1627, doi:10.3390/foods9111627.
24. Nayak, A.; Bhushan, B.; Rosales, A.; Turienzo, L.R.; Cortina, J.L., *Food and Bioproducts Processing* **2018**, *109*, 74–85, doi:10.1016/j.fbp.2018.03.004.
25. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M., *Methods in Enzymology* **1999**, *299*, 152–178, doi:10.1016/S0076-6879(99)99017-1.
26. Geana, E.-I.; Ciucure, C.T.; Tamaian, R.; Marinas, I.C.; Gaboreanu, D.M.; Stan, M.; Chitescu, C.L., *Antioxidants* **2023**, *12*, 1383, doi:10.3390/antiox12071383.
27. Kim, D.-O.; Jeong, S.W.; Lee, C.Y. A., *Food Chemistry* **2003**, *81*, 321–326, doi:10.1016/S0308-8146(02)00423-5.
28. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J., *Analytical Biochemistry* **1996**, *239*, 70–76, doi:10.1006/abio.1996.0292.
29. Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Hawkins Byrne, D., *Journal of Food Composition and Analysis* **2006**, *19*, 669–675, doi:10.1016/j.jfca.2006.01.003.
30. Meng, Z.; Zheng, X.; Tang, K.; Liu, J.; Ma, Z.; Zhao, Q., *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, *51*, 440–448, doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.05.030.
31. Onache, P.A.; Geana, E.I.; Ciucure, C.T.; Florea, A.; Sumedrea, D.I.; Ionete, R.E.; Tița, O., *Separations* **2022**, *9*, 395, doi:10.3390/SEPARATIONS9120395/S1.
32. Abouelenein, D.; Mustafa, A.M.; Caprioli, G.; Ricciutelli, M.; Sagratini, G.; Vittori, S., *Food Bioscience* **2023**, *53*, 102808, doi:10.1016/j.fbio.2023.102808.
33. Moro, K.I.B.; Bender, A.B.B.; Ferreira, D. de F.; Speroni, C.S.; Barin, J.S.; da Silva, L.P.; Penna, N.G., *LWT* **2021**, *150*, 112066, doi:10.1016/j.lwt.2021.112066.
34. Heravi, S.; Rahimi, M.; Shahriari, M.; Nejad Ebrahimi, S., *Chemical Engineering Research and Design* **2022**, *183*, 382–397, doi:10.1016/j.cherd.2022.05.011.
35. Arboleda Mejia, J.A.; Ricci, A.; Figueiredo, A.S.; Versari, A.; Cassano, A.; Parpinello, G.P.; De Pinho, M.N., *Foods* **2020**, *9*, 1649, doi:10.3390/foods9111649.
36. Zurbriggen, M.D.; Moor, A.; Weber, W., *Journal of Biotechnology* **2012**, *160*, 80–90, doi:10.1016/j.jbiotec.2012.01.014.
37. Mollica, A.; Scioli, G.; Della Valle, A.; Cichelli, A.; Novellino, E.; Bauer, M.; Kamysz, W.; Llorent-Martínez, E.J.; Fernández-de Córdova, M.L.; Castillo-López, R.; et al., *Antioxidants* **2021**, *10*, 1704, doi:10.3390/antiox10111704.
38. Pedras, B.M.; Regalin, G.; Sá-Nogueira, I.; Simões, P.; Paiva, A.; Barreiros, S., *The Journal of Supercritical Fluids* **2020**, *160*, 104793, doi:10.1016/j.supflu.2020.104793.
39. Zambrano, C.; Kerekes, E.B.; Kotogán, A.; Papp, T.; Vágvölgyi, C.; Krisch, J.; Takó, M., *LWT* **2019**, *100*, 416–425, doi:10.1016/j.lwt.2018.10.044.



## REVENDICĂRILE INVENȚIEI

1. Procedeu de obținere a extractelor/ingredientelor polifenolice din tescovină de struguri (*Vitis Vinifera* L.) prin extracție enzimatică combinată cu extracție asistată de microunde, urmată de purificarea extractelor.
2. Extractul/ingredientul polifenolic din tescovină de struguri albi obținut conform revendicării 1 caracterizat prin aceea că prezintă un conținut total de polifenoli de 438,27 mg GAE/g extract, conținut de flavonoizi totali de 19,78 mg QE/g extract, activitate antioxidantă de 5112,34  $\mu$ M TE/g extract și un profil polifenolic caracterizat de compuși precum procianidina B2 (916,53  $\mu$ g/g), catechină (377,35  $\mu$ g/g), epicatechină (247,01  $\mu$ g/g), quercetin (366,98  $\mu$ g/g), kaempferol (435,10  $\mu$ g/g), acid siringic (115,13  $\mu$ g/g), taxifolin (89,38  $\mu$ g/g), acid abietic (76,95  $\mu$ g/g), acid ferulic (61,66  $\mu$ g/g), acid 4-hidroxibenzoic (37,95  $\mu$ g/g), acid elagic (36,42  $\mu$ g/g), acid shikimic (28,90  $\mu$ g/g), acid abscisic (25,07  $\mu$ g/g), isorapontigenin (26,83  $\mu$ g/g); extractul prezintă activitate antimicrobiană asupra tulpinilor Gram negative (*E. faecalis*, *S. epidermidis*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* și *C. Albicans*) și biocompatibile cu linia de keratinocite HaCaT.
3. Extract/ingredient polifenolic din tescovină de struguri roșii obținut conform revendicării 1 caracterizat prin aceea că prezintă un conținut total de polifenoli de 618,58 mg GAE/g extract, conținut de flavonoizi totali de 51,39 mg QE/g extract, activitatea antioxidantă de 6908,30  $\mu$ M TE/g extract și un profil polifenolic caracterizat de compuși precum procianidin B2 (1426,54  $\mu$ g/g), oenină (833,58  $\mu$ g/g), acid siringic (790,92  $\mu$ g/g), catechină (448,83  $\mu$ g/g), epicatechină (375,65  $\mu$ g/g), acid p-cumaric (287,56  $\mu$ g/g), quercetin (366,98  $\mu$ g/g), acid cafeic (131,98  $\mu$ g/g), acid vanilic (113,39  $\mu$ g/g), acid ferulic (33,58  $\mu$ g/g), isorhamnetin (36,37  $\mu$ g/g), isorapontigenin (54,99  $\mu$ g/g); extractul prezintă activitate antimicrobiană asupra tulpinilor Gram negative (*S. aureus*, *E. faecalis*, *P. mirabilis* și *P. aeruginosa*) și biocompatibile cu linia de keratinocite HaCaT.



## Figuri și tabele explicative pentru invenție

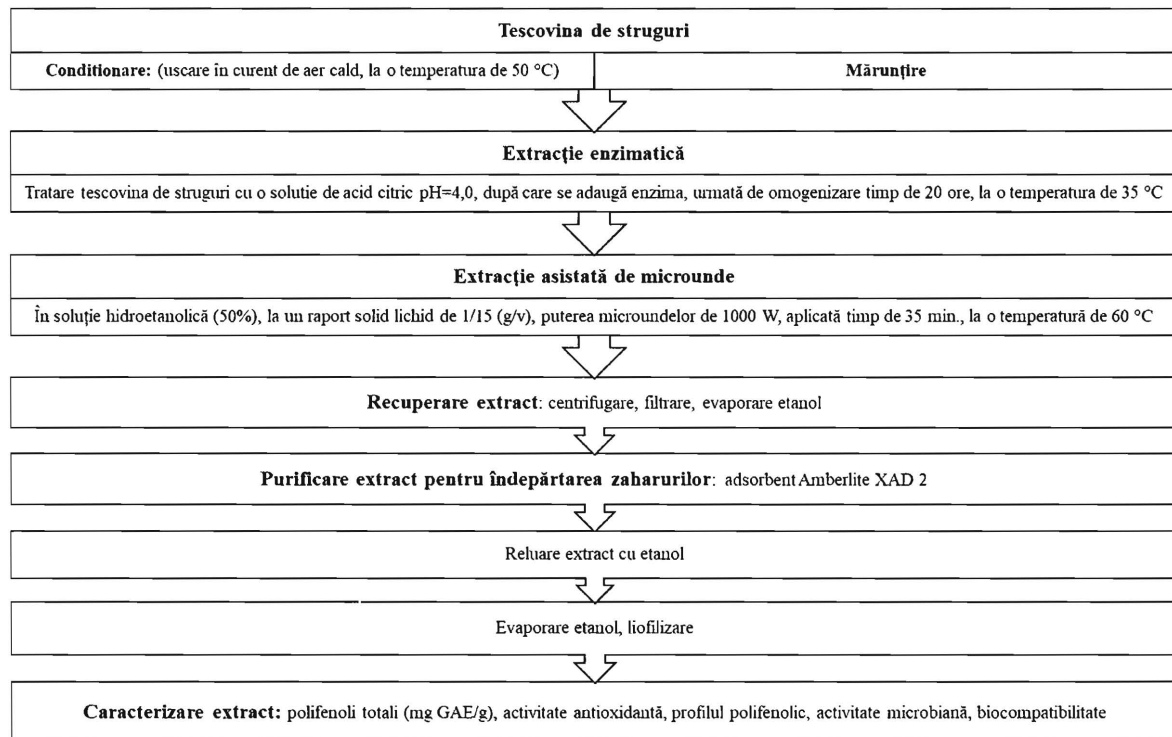


Figura 1. Schema de obținere a extractului/ingredientului polifenolic conform invenției

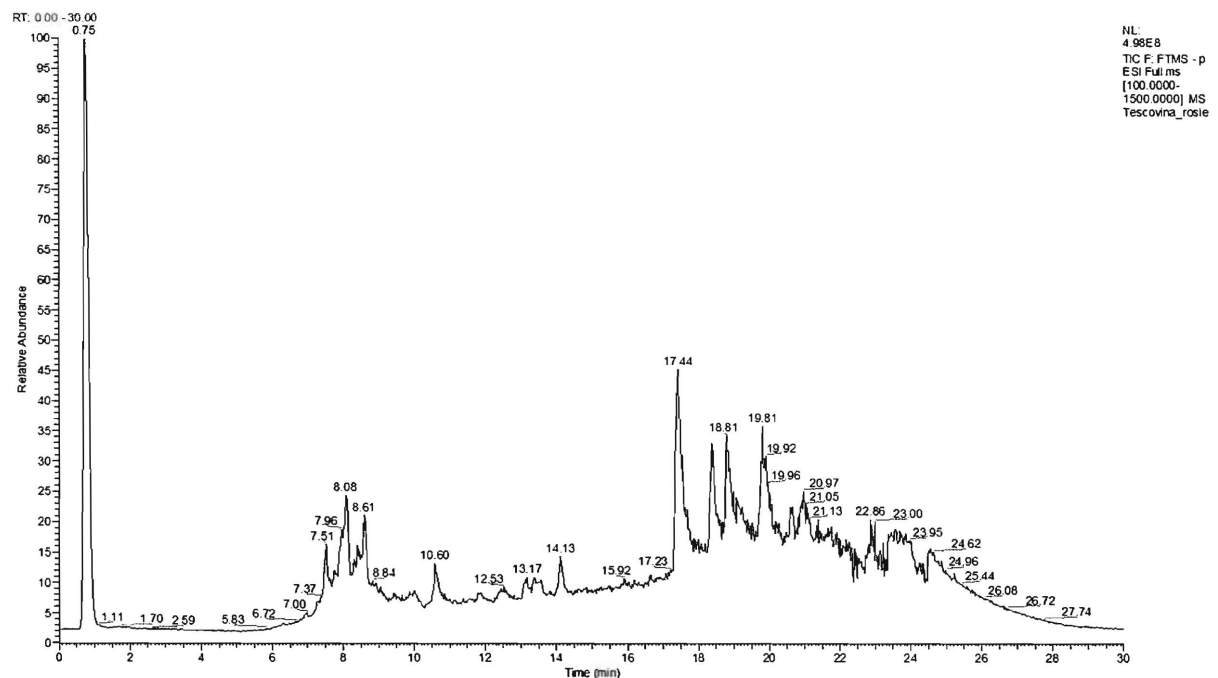


Figura 2. Cromatograma curentului ionic total (TIC) pentru extractul polifenolic din tescovina de struguri, în modul de ionizare negativ



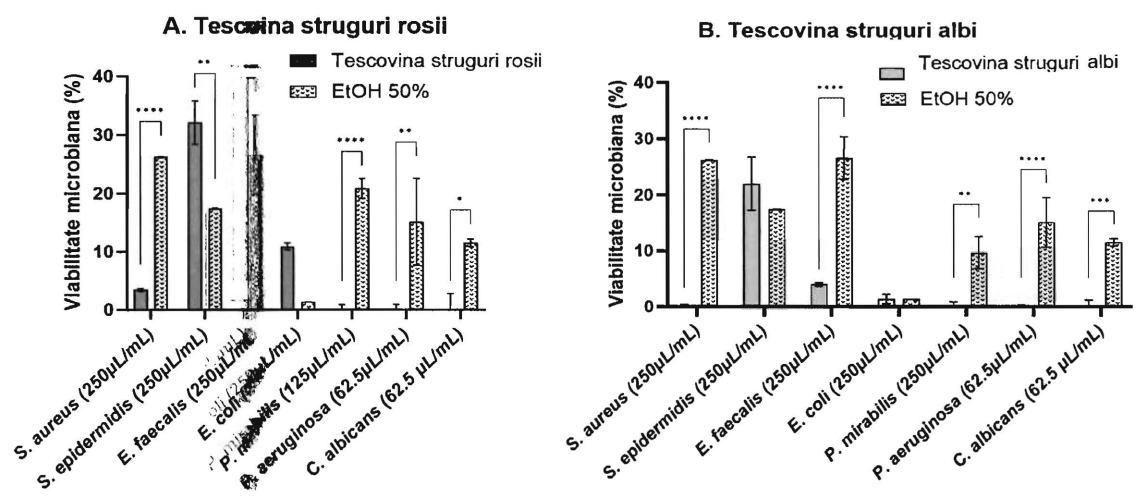


Figura 3. Activitatea antimicrobiană pentru extractele etanolice obținute din tescovina de struguri roșii (A) și tescovina de struguri albi (B) la concentrații fixe

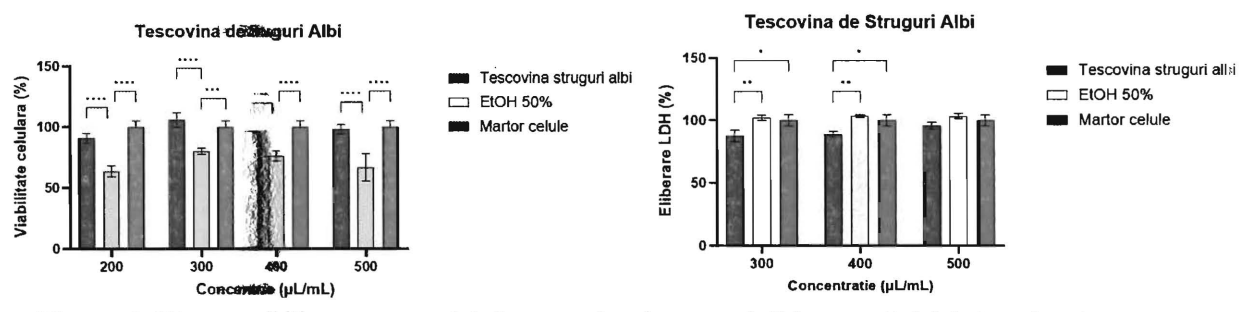


Figura 4. Biocompatibilitatea extractului din tescovina de struguri albi asupra liniei de keratinocite umane HaCaT evaluată prin metodele MTT (A) și cuantificarea eliberării de LDH extracelular LDH (B)

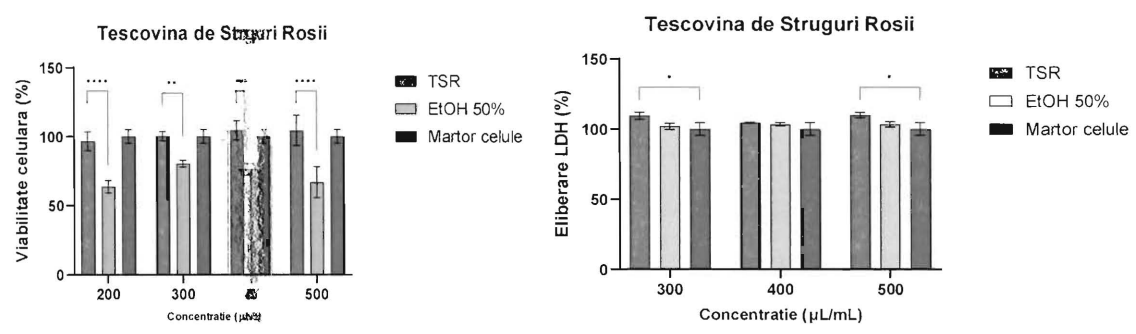


Figura 5. Biocompatibilitatea extractului din tescovina de struguri roșii asupra liniei de keratinocite umane HaCaT evaluată prin metodele MTT (A) și cuantificarea eliberării de LDH extracelular LDH (B)

Five handwritten signatures in black ink, arranged horizontally across the page.



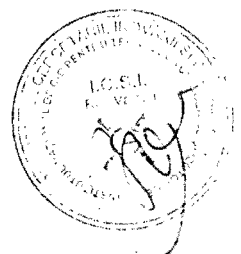


**Tabelul 1.** Proprietățile bioactive ale extractului hidroetanolic din tescovina de struguri

Proprietăți bioactive extractului etanolic	Tescovina struguri albi	Tescovina struguri rosii
TEAC ( $\mu\text{M}$ Trolox/mL)	10821,36	21523,64
CUPRAC ( $\mu\text{M}$ Trolox/mL)	13764,4	16603,84
FRAP ( $\mu\text{M}$ Trolox/mL)	10430	22006,00
DPPH ( $\mu\text{M}$ Trolox/L)	10408,89	21380,56
Total polifenoli (mg GAE/L)	2115,36	3950,52
Total flavonoizi (mg QE/L)	53,80	87,21

**Tabelul 2.** Proprietățile bioactive ale extractelor/ingredientelor polifenolice din tescovina de struguri

Proprietăți bioactive extract	Extract din tescovina struguri albi	Extract din tescovina struguri rosii
Total polifenoli (mg GAE/g extract)	438,27	618,58
Total flavonoizi (mg QE/g)	19,78	51,39
Activitatea antioxidantă ( $\mu\text{M}$ TE/g extract)	5112,34	6908,30





**Tabelul 3. Identificarea prin UHPLC-MS/MS și cuantificarea compușilor fenolici în extracțele/ingredientele polifenolice din tescovina de struguri albi (TSA) și roșii (TSR)**

Nr. crt.	Compus	Timp de retenție [min]	Formula moleculară	Masa Exactă	Ion aduct experimental (m/z) [M-1]	Fragmente de masă	TSA (μg/g extract)	TSR (μg/g extract)
<b>Acizi fenolici</b>								
1	Acid Shikimic	0,74	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	174,0528	173,0446	93,0348; 111,0439	28,90	16,15
2	Acid Galic	2,07	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	170,0215	169,0133	125,0231	9,97	15,07
3	Acid 3,4-dihidroxybenzoic	3,87	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	154,0266	153,0184	109,0281	7,84	2,41
4	Acid 2,5-dihidroxybenzoic	6,75	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	154,0266	153,0184	109,0342; 153,0261	3,85	5,84
5	Acid 4-hidroxybenzoic	7,01	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138,0316	137,0233	118,9650; 96,9588; 71,0124	37,95	2,63
6	Acid Vanilic	7,91	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	168,0422	167,0340	152,0116; 108,0229; 123,0441	9,51	113,39
7	Acid Chlorogenic	7,93	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	354,0950	353,0880	191,0553	3,35	9,26
8	Acid Caffeic	8,03	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	180,0422	179,0343	135,0439	19,50	131,98
9	Acid Syringic	8,23	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	198,0528	197,0450	182,0212; 166,9976; 153,0547; 138,0311; 123,0075	115,13	790,92
10	Acid p-Coumaric	8,69	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	164,0473	163,0390	119,0489	21,26	287,56
11	Acid t-Ferulic	8,89	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194,0579	193,0499	178,0262; 134,0361	61,66	33,58
12	Acid Synapic	8,92	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>12</sub>	224,0684	223,0607	79,7560; 95,9510; 118,9651	0,55	0,78
13	Acid Elagic	9,69	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	302,0062	300,9990	300,9990	36,42	17,37
14	Acid Abscisic	9,97	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	264,1361	263,1290	179,9803; 191,9454	25,07	11,45
15	Acid Abietic	21,21	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	302,2245	301,2172	96,9587; 183,0113; 79,9559	76,95	25,47
<b>Flavonoizi</b>								
16	Catechin	7,57	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290,0790	289,0719	109,0282; 123,0349; 125,0232;	377,35	448,83
17	Epicatechin	8,15	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290,0790		137,0232; 151,0390; 203,0708	247,01	376,65
18	Procianidin B2	7,81	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	578,1424	577,1353	125,0231; 289,0719; 407,0774	916,53	1426,54
19	Taxifolin	8,81	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	304,0582	303,0509	147,0440; 257,0814	89,38	26,67
20	Vitexin	8,98	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	432,1056	431,0983	341,0664; 269,0454; 240,0422;	3,66	10,14
21	Naringin	9,22	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	580,1791	579,1718	197,0606	1,54	2,30
22	Rutin	9,44	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	610,1533	609,1473	301,0352; 300,0276	2,05	2,25

*Handwritten signature*

*Handwritten signature*

*Handwritten signature*

*Handwritten signature*

*Handwritten signature*



Nr. crt.	Compus	Timp de retenție [min]	Formula moleculară	Masa Exactă	Ion aduct experimental (m/z) [M-1]	Fragmente de masă	TSA (μg/g extract)	TSR (μg/g extract)
23	Hesperidin	9,44	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	610,1897	609,1828	377,0876	2,03	2,22
24	Miricetin	9,85	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	318,0375	317,0303	178,9986; 164,9263; 151,0036; 137,0244; 107,0125	0,26	20,51
25	Quercetin	10,72	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302,2357	301,0356	151,0226; 178,9977; 121,0282; 107,0125	366,98	283,66
26	Kaempferol	11,69	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286,0477	285,0406	151,0389; 117,0180	435,10	20,48
27	Isoramnnetin	11,93	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	316,0582	315,0515	300,0277	26,12	36,37
28	Apigenin	11,97	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270,0528	269,0455	117,0333; 151,0027; 107,0126	2,73	1,70
29	Pinocembrin	12,74	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	256,0735	255,0663	213,0551; 151,0026; 107,0125	8,76	1,88
30	Crisin	13,77	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	254,0579	253,0505	143,0491; 145,0284; 107,0125; 209,0603; 63,0226; 65,0019	0,97	0,57
31	Galangin	14,01	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	270,0528	269,0455	169,0650; 143,0491	0,87	0,21
<b>Stilbeni</b>								
32	t-Piceatanol	8,96	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	244,0735	243,0658	177,0548; 173,0811; 137,0233	0,23	0,39
33	t-Resveratrol	9,52	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	228,0786	227,0707	185,0813; 143,0337	8,33	5,45
34	Isorapontigenin	10,30	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	258,0892	257,0819	241,0504; 125,0231; 175,0392; 217,0502; 175,0393	26,83	54,99
<b>Dihidrocalcone</b>								
35	Florizin	9,44	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	436,1369	435,1296	107,0553	5,11	1,56
36	Floretin	10,88	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	274,0841	273,0768	93,0332; 121,0283	2,39	2,76
<b>Antocianidine</b>								
37	Malvidin-3-glucozida (oenina)	8,49	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	493,1340	492,1229	492,1229; 329,0663	40,63	833,58

Tabelul 4. Activitatea antimicrobiană a extractelor etanolice din tescovina de struguri

Tulpini / Extracte din tescovină de struguri	Concentrația minimă inhibitorie (μL/mL)	Concentrația minimă microbicidă (μL/mL)	Concentrația minimă de inhibare a aderenței microbiene (μL/mL)
<b><i>S. aureus</i></b>			
Tescovină struguri albi	250	500	125
Tescovină struguri roșii	125	500	125
Etanol 50%	500	>500	500
<b><i>S. epidermidis</i></b>			
Tescovină struguri albi	250	250	250
Tescovină struguri roșii	250	500	250
Etanol 50%	250	>500	250
<b><i>E. faecalis</i></b>			
Tescovină struguri albi	250	500	125
Tescovină struguri roșii	250	>500	250
Etanol 50%	500	>500	500
<b><i>E. coli</i></b>			
Tescovină struguri albi	250	500	250
Tescovină struguri roșii	125	500	125
Etanol 50%	250	500	250
<b><i>P. mirabilis</i></b>			
Tescovină struguri albi	125	>500	125
Tescovină struguri roșii	125	>500	125
Etanol 50%	250	>500	250
<b><i>P. aeruginosa</i></b>			
Tescovină struguri albi	62,5	250	62,5
Tescovină struguri roșii	62,5	250	62,5
Etanol 50%	125	250	62,5
<b><i>C. albicans</i></b>			
Tescovină struguri albi	62,5	>500	62,5
Tescovină struguri roșii	62,5	500	62,5
Etanol 50%	62,5	500	62,5

