

**VALORIFICAREA REZIDUURILOR DIN
VINIFICATIE CA ADITIVI ALIMENTARI SI
ANTIOXIDANTI IN INDUSTRIE**

Director proiect : Prof. Univ. Dr. Natalia Rosoiu

CUPRINS

INTRODUCERE.....	3
I. BIOTEHNOLOGII PENTRU OBTINEREA PRINCIPIILOR ACTIVE - Procese de prelucrare reziduuri vegetale.....	6
II. METODE DE EVALUARE A ACTIVITATII BIOCOMPONENTELOR EXTRASE.....	9
II.1 Testarea biocomponentelor in sisteme aceluare	9
II.2 Testarea citotoxicitatii principiilor active.....	13
II.3. Testarea activitatii antioxidante si antiinflamatoare <i>in vitro</i>	
III. REZULTATE EXPERIMENTALE.....	19
IV. CONCLUZII.....	35
V. BIBLIOGRAFIE.....	37

INTRODUCERE

Tescovina este reziduul rezultat din procesul de vinificație (coji, samburi, codite) și este o sursă importantă de compuși polifenolici (derivati ai acidului hidroxicinamic și acidului hidroxibenzoic, flavonoide, antociani, taninuri, proantocianidine, stilbeni) [1]. Dintre acestea, flavonoidele sunt cele mai abundente și studiate pe scară largă, cu proprietăți biologice, incluzând activități antioxidante, antiinflamatoare, anti-canceroase, antimicrobiene, antivirale, cardioprotectoare, neuroprotectoare și hepatoprotectoare [2]. Polifenolii scad inflamația cronică fie prin modularea căilor inflamatorii, fie prin reducerea nivelurilor speciilor reactive de oxigen. De asemenea, s-a demonstrat că proantocianidinele din semințele de struguri au o acțiune antiinflamatorie ridicată, deoarece au rolul de a capta radicalii liberi, previn peroxidarea lipidelor și inhibă formarea citokinelor proinflamatorii [3]. Valorificarea tescovinei ca sursă importantă de fitocompuși bioactivi cu aplicații în domeniul farmaceutic, cosmetic și alimentar, constituie o alternativă eficientă, profitabilă și ecologică pentru reziduurile generate în procesul de vinificație.

Un prim impact al substanțelor de origine vegetală la nivel de organism / țesut / celulă poate fi considerat efectul antioxidant al acestora, bazat pe o pleiadă de componente și structuri chimice ce sunt extrase în anumite proporții și care pot concura sinergic la captarea unor radicali liberi reactivi sau activarea unor enzime cu rol în transformarea acestora în molecule mai puțin nocive.

În condiții normale există un echilibru între sistemele antioxidante și cele pro-oxidante, generatoare de radicali liberi. Perturbarea acestui echilibru în favoarea sistemelor prooxidante determină instalarea stresului oxidativ (SO), cu implicații patologice. Radicalii liberi ai oxigenului, ca și speciile reactive ale azotului (RNS) sunt produși ai metabolismului celular normal, având un rol dual, putând fi atât benefici cât și nocivi sistemelor vii. Oxigenul se poate transforma în specii reactive ce sunt implicate în controlul diferitelor procese

biologice, inclusiv activarea celulara, proliferarea si moartea, inflamatiile chiar, prin generarea unor cascade citokinice de propagare a acestora. Pe langa efectele catabolice in lant pe care speciile reactive le produc la nivelul organismului, degradarea oxidativa are loc si in produsele alimentare, producand modificari organoleptice si in privinta aportului nutritiv. In acest context, utilizarea antioxidantilor naturali ca adjuvanti in produsele alimentare poate atinge doua tinte: de preventie / terapeutica prin blocarea stressului oxidativ celular, respectiv de conservare a proprietatilor nutritive si a aspectului preparatelor respective cu prelungirea termenului de valabilitate. Un aspect semnificativ il reprezinta inlocuirea din aceste alimente a compusilor de sinteza, cu excluderea efectelor nocive asociate, cu substante cu impact benefic asupra organismului.

Inflamația este răspunsul protector al țesuturilor împotriva leziunilor celulare, iritației și invaziilor patogene. Inflamația cronică este considerată a fi principalul mediator în dezvoltarea bolilor cronice cum ar fi cancerul, bolile neurodegenerative, bolile cardiovasculare, diabetul, artrita, bolile autoimune și pulmonare. Producția intensivă și secreția citokinelor și chemokinelor proinflamatorii, odată începute, pot forma gradienti de concentrație în țesuturile afectate, ceea ce poate duce la amplificarea răspunsului inflamator inițial. IL-6 este o citokină implicată nu numai în inflamație și în răspunsul la infecții, ci și în reglarea proceselor metabolice, regenerative (Scheller et al., 2011). Promotorii tumorali, citokinele proinflamatorii, endotoxinele și inhibitorii proteinelor de sinteză pot modula cinetica ciclului celular al diferitelor tipuri de celule, pot stimula producerea de specii reactive de oxigen și pot induce secreția interleukinei-8 (IL-8), un chemotactant puternic pentru neutrofile polimorfonucleare Limfocite T (Wilmer et al., 1995). IL-8 este eliberat din mai multe tipuri de celule ca răspuns la inflamație, incluzând monocite, macrofage, neutrofile și celule intestinale, rinichi, placenta și măduva osoasă (Bickel, 1993).

Studiul se refera la determinarea efectului extractelor active din deseuri de struguri asupra unor specii reactive ale oxigenului, *specie radicalica anorganica*: superoxidul ($O_2^{\bullet-}$) si *neradicalica*: peroxidul de hidrogen (H_2O_2), si asupra sistemului antioxidant enzimatic superoxidismutaza (SOD) - catalaza (CAT). De asemenea, avand in vedere impactul inflamatiei in majoritatea fenomenelor la nivel de tesut sau organism si corelarea acesteia cu procesele oxidative, am investigat si impactul compusilor asupra principalilor mediatori extracelulari, citokinele IL6 si IL8, eliberati de keratinocite si fibroblasti. S-au utilizat modele experimentale acelulare si celulare, aplicand metode biochimice si flow-citometrie.

I. BIOTEHNOLOGII PENTRU OBTINEREA PRINCIPIILOR ACTIVE - Procese de prelucrare reziduuri vegetale

Prelucrarea strugurilor se efectuează imediat după descărcare în buncarul de recepție din inox. Strugurii sănătoși sunt preluați de un snec, care îi transportă până în buncarul de recepție al



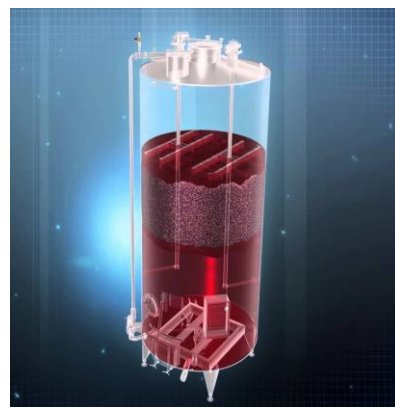
desciorchinatorului-zdrobitor, unde în prima etapă are loc separarea boabelor de pe ciorchini (rahisuri), urmată de zdrobirea menajantă a acestor boabe de către două valțuri, construite din cauciuc alimentară, pentru a nu permite spargerea semintelor și

distrugerea pielitelor boabelor de struguri. De la desciorchinare rezultă și un subprodus, care se numește rahis (suportul pe care sunt fixate boabele) și care este preluat de un aspirator cu ciclon și se colectează separat într-o remorcă auto și se



poate folosi în hrana animalelor sau poate fi transformat în îngrășământ natural, ce se poate folosi în plantația de viță de vie. În urma zdrobirii rezultă un amestec de must, pulpă, semințe și pielite, care se numește mustuială și care este preluată de monopompă cu surub și

transportata in diferite echipamente si utilaje, in functie de culoarea si intensitatea aromatica a strugurilor din care a provenit. La tehnologia de obtinere a **vinurilor rosii**, mustuiala se pompeaza cu ajutorul monopompei cu surub in vinificatoarele cu piston, unde se insamanteaza cu drojdii selectate pentru realizarea controlata a fermentatiei alcoolice. In cazul acestei tehnologii etapa tehnologica de macerare se realizeaza concomitent cu fermentatia alcoolica, cand datorita alcoolului si a bioxidului de carbon rezultate din fermentare are loc o extractie si o difuzie mult mai buna a substantelor colorante si a celor de aroma din pielitele boabelor de struguri.



Macerarea-fermentarea la vinurile rosii, dureaza in functie de continutul initial de zahar al strugurilor si de temperatura de lucru (22-28 grade Celsius), 7 – 10 zile, timp in care pentru o cat mai buna extractie are loc scufundarea bostinei (pielitele cu pulpa si o parte din seminte), de minim doua ori pe zi, cu ajutorul pistonului electric, care permite un contact foarte bun intre mustul in fermentare si pielitele boabelor de struguri si totodata pastreaza integritatea acestor pielite, deci asigura un mod de lucru foarte menajant. La finalizarea fermentatiei alcoolice are loc separarea vinului rosu ravac de bostina, care este pompata cu ajutorul monopompei cu surub in cele doua prese pneumatice inchise, pentru recuperarea intregii cantitati de vin ramas in pielite. Operatia de presare cu ajutorul presei pneumatice se realizeaza la o presiune maxima de 1.2 bar, deci o presiune foarte mica, ceea ce impiedica spargerea semintelor si permite obtinerea unui vin de foarte buna calitate.



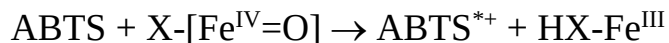
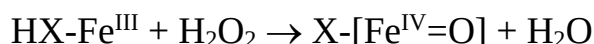
Tescovina rezultata in urma presarii este un produs secundar al vinificatiei si este evacuata din presa cu ajutorul unui snec. Tescovina, avand si denumirea de boasca sau bostina, reprezinta resturi de pulpa, samburi si coji de struguri ramase dupa prepararea vinului, este recomandata de medicina traditionala drept un medicament natural antiimbatrinire, datorita continutului mare de antioxidanti, in special resveratrol.

II. METODE DE EVALUARE A ACTIVITĂȚII BIOCOMPONENTELOR EXTRASE

II.1 Testarea biocomponentelor în sisteme aceluare

Acțiunea antioxidantă/ antiradicalică *in vitro* în sistem **acelular**, s-a determinat prin două metode spectrofotometrice:

a) Evaluarea statusului antioxidant total (TAS) - reducerea radicalului ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), indicând nivelul de antioxidanți existenți în extractul testat. În vederea obținerii radicalului stabil de culoare albastru-verzui $ABTS^{*+}$ ce poate fi cuantificat prin măsurarea absorbantei la $\lambda = 405 \text{ nm}$, se incubează o soluție de ABTS și H_2O_2 , în prezența peroxidazei. Antioxidantul determină diminuarea intensității culorii formate în urma reacției, proporțional cu concentrația lor conținută în proba de analizat.



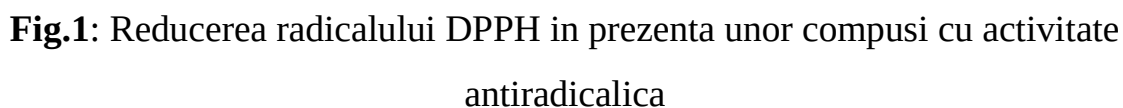
unde: $HX-Fe^{III}$ – metmioglobin

$X-[Fe^{IV}=O]$ – ferilmioglobin

ABTS – 2,2'-Azino-di-[3-etilbenziazolin sulfonat]

b) Reducerea radicalului DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Analiza capacității de captare a radicalilor liberi DPPH, este un test de decolorare care, măsoară capacitatea antioxidantilor de a reacționa în mod direct cu radicalii DPPH (scavenge) prin monitorizarea spectrofotometrică a absorbției sale la 517 nm. Radicalul DPPH este un radical liber stabil organic centrat pe azot cu o culoare purpurie închisă atunci când este redus la forma nonradicală de către antioxidanți devine incolor.

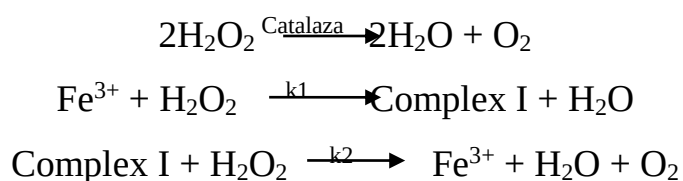


Evaluarea efectului antioxidant *in vitro* in sistem **acelular** al extractelor TES asupra a doua enzime oxidative purificate din sursa bovina (catalaza si superoxid dismutaza), s-a realizat prin urmatoarele metode:

Catalaza este o enzima heminica tetramerică alcătuită din 4 subunități identice aranjate tetraedric, fiecare având 60000 g/mol ce conține 4 grupe feriprotoporfirinice per moleculă, masa moleculară a sa fiind de aproximativ 240000Da.

Catalaza exercita o actiune duala deoarece pe de o parte catalizeaza descompunerea H_2O_2 cu formare de H_2O si O_2 (activitate catalazica), iar pe de alta parte favorizeaza oxidarea donatorilor de hidrogen (metanol, etanol, acid formic, fenoli) cu consumarea unui mol de peroxid (activitate peroxidazica).

Reactia predominanta depinde de concentratia donorului de H si de viteza de productie a H_2O_2 in sistem.

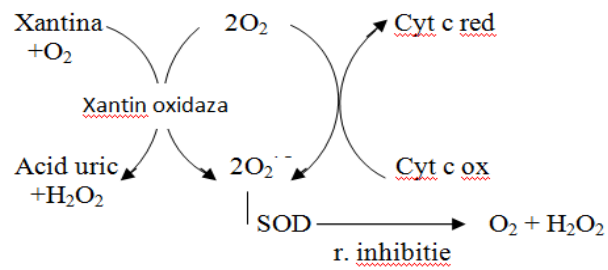


In ambele cazuri, se formeaza Complexul I catalaza activa- H_2O_2 . Descompunerea H_2O_2 , in care o alta molecula de H_2O_2 serveste ca donator de H pentru complexul I, prezinta o viteza de reactie foarte mare, in timp ce reactiile peroxidative sunt relativ lente.

Descompunerea apei oxigenate este o reactie de ordinul I, a carei viteza este intotdeauna proportionala cu concentratia de peroxid. Ca urmare, pentru a evita o scadere rapida a vitezei initiale de reactie, determinarile sunt efectuate la concentratii de H_2O_2 relativ scazute (aproximativ 0.01 mol/l).

d) Determinarea activitatii enzimatice a superoxid dizmutazei din eritrocite bovine

Pentru evaluarea activitatii enzimatice a SOD s-a utilizat o metoda indirecta prin cuplarea reactiei de descompunere a anionului superoxid in prezenta SOD cu reactia de reducere a citocromului c de catre radicalul superoxid (produs enzimatic in reactia dintre xantina si O_2)



O unitate enzimatica va scadea viteza de reducere a cytocromului c cu 50% intr-un sistem cuplat xantina/xantin-oxidaza.

II.2 Testarea citotoxicitatii principiilor active

Potentialul citotoxic si activitatea biologica in sistem **celular** a fost evaluata prin testarea complexului TES pe doua linii celulare standardizate: fibroblasti umani normali (HS27) si keratinocite umane normale imortalizate (HaCaT).

a) **Evaluarea efectului citotoxic al extractului TES prin stabilirea corelatiei dintre scaderea viabilitatii celulare (testul MTS) si cresterea activitatii enzimatice in mediul de cultura (testul LDH) .**

Aceasta metoda se bazeaza pe degradarea membranei celulare, determinand eliberarea de citoplasma in mediul extracelular ca urmare a expunerii celulelor la actiunea compusilor/ produsilor testati.

Testul LDH. LDH-ul eliberat catalizeaza reactia dintre NAD^+ si lactat cu formare de piruvat si NADH (Nicotinamida Adenin Dinucleotida), care prin interactia cu INT, in prezenta de diaforaza, conduce la NAD^+ si formazan; aceste reactii au loc in urma unei incubari de 30 min la temperatura camerei.

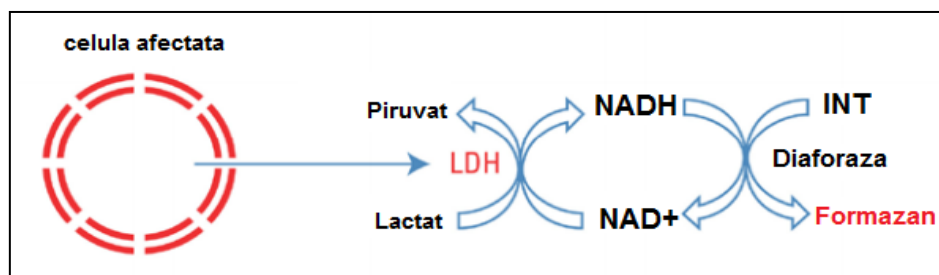


Fig.3: Reactia de eliberare a LDH

Testul MTS. MTS este o sare de tetrazoliu solubila care este redusa de celule intr-un produs de tip formazan, de asemenea solubil in mediul de cultura. Aceasta conversie este realizata de NADH in celulele metabolic active la 37°C , cantitatea de formazan formata fiind proportionala cu numarul de celule vii. Intensitatea culorii formate dupa incubarea MTS-ului adaugat peste celule este cuantificata folosind un cititor in placi setat la 490 nm.

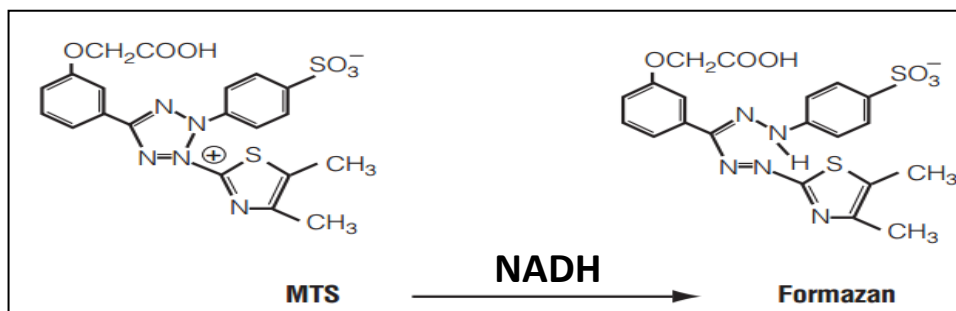


Fig.4: Reactia de reducere a MTS

Astfel, prin corelarea testului MTS cu cel de eliberare a LDH se poate cuantifica corect efectul unui compus/ produs asupra viabilitatii celulare.

II.3. Testarea activitatii antioxidante si antiinflamatoare in sistem celular

a) Evaluarea stresului oxidativ intracelular prin citometrie in flux prin identificarea simultana a radicalilor oxigenati intracelulari (anion superoxid si apa oxigenata)

Capacitatea de reducere a nivelului H_2O_2 și O_2^- intracelular a unei substanțe test este evaluată la nivel celular pentru a decela posibilul efect asupra proceselor de apărare față de efectele nocive ale speciilor reactive de oxigen. Anionul superoxid este format de lanțul de transport electronic, NADPH oxidaze, nitric oxid sintaza, xantin-oxidaza și citocrom P-450, în funcție de stimulii patologici și fiziologici, fiind precursorul apei oxigenate, a peroxinitritului, și a altor specii puternic oxidate care produse în cantitate mică modulează activitatea enzimatică și cascadele de transducere a semnalului, dar în cantitate mare produc stresul oxidativ celular (QUIJANO et al., 2007).

Metoda de identificare simultană a nivelurilor intracelulare de H_2O_2 și O_2^- prin marcarea cu DCFH-DA, respectiv HE:

Principiul metodei: DCFH-DA este încorporat în regiunea lipidică hidrofobă unde enzimele hidrolitice clivează restul diacetat, lăsând molecula nefluorescentă DCFH (dichlorofluoresceina) să pătrundă în citoplasmă datorită polarității. În condițiile activării celulare, apa oxigenată și peroxidazele intracelulare oxidează molecula la DCF – compus fluorescent ce emite la 530nm

(FITC-A). Hidroxiethidina (HE) permeabil prin membrana celulară, formând după oxidarea de către anionii superoxid bromura de etidiu care se leagă de acizii nucleici și emite la 620nm (PE-A) (CARINI et al., 2000; ROBINSON et al., 2009).

Rezultatele sunt achiziționate cu citometrul în flux FACS CantoII și analizate cu softul Diva 6. Cantitatea de apă oxigenată, respectiv anionul superoxid intracelular corespund variației mediilor canalelor de fluorescență în cele 2 coordonate: FITC – A mean – pentru apa oxigenată și PE-A mean – pentru anionul superoxid (Fig. de mai jos).

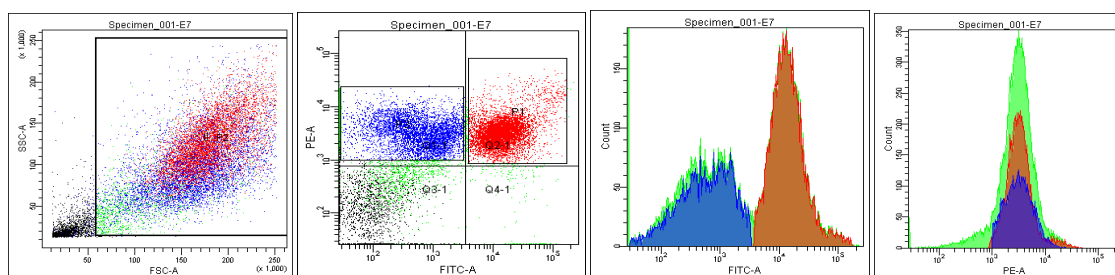


Figura 1 Evidențierea, în coordonate FSC /SSC a populației celulare normale, apoi a subpopulațiilor respondente la activarea celulară a apei oxigenate (FITC – A), respectiv a anionului superoxid (PE-A)

b)Evaluarea activitatii enzimatice a Catalazei si Superoxid dismutazei intracelulare in prezenta extractului TES.

Vor fi utilizate doua metode spectrofotometrice de determinare a activitatii enzimatice a catalazei (reactie de descompunere a apei oxigenate in apa si O₂) si a superoxid dismutazei (monitorizarea inhibitiei procesului de reducere a citocromului c de catre radicalul superoxid). Detectia se realizeaza prin tehnicile descrise pentru sistemele experimentale acelulare.

c)Evaluarea continutului de glutatation celular prin citometrie in flux

Glutathionul (GSH) este o sulfhidril tripeptida (*glu-cys-gly*) prezenta in concentratii milimolare in majoritatea celulelor eucariote. Este un agent reductor intracelular implicat in multiple procese celulare, protejand celula de speciile de radicali liberi, peroxid de hidrogen si peroxizi organici, reactii catalizate de glutathion – S-transferaza si glutathion peroxidaza. **Glutathionul** are un dublu rol:

- in **procesele de detoxifiere** prin legare la metale grele, solventi, pesticide si transformarea lor in substante excretabile
- **ca antioxidant** prin mentinerea gruparilor –SH din proteine in forma redusa.

Detectia lui este importanta in estimarea statusului celular antioxidant intrinsec. Determinarea glutathionului intracelular se va face prin marcare cu anticorpi fluorescenti(ex. **anticorp ABCAM anti-glutathion; anticorp secundar** An Alexa-Fluor 488 conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) si analiza prin citometrie in flux.

Protocolul de lucru:

- permeabilizarea membranei celulare si fixarea pe baza de paraformaldehida, cu kit Cytotfix/Cytoperm,
- marcarea Glutathionului intracelular cu anticorpul primar: Anti-Glutathion antibody (AB19534-ABCAM),
- cuplarea anticorpului secundar fluorescent goat-anti-mouse IgG – Alexa Fluor 488 cu emisie FITC
- analiza histogramelor de fluorescenta prin citometrie in flux.

Emisia fluorescenta se compara cu cea a **controlului izotipic Mouse monoclonal IgG2a (AB10191- ABCAM.)**

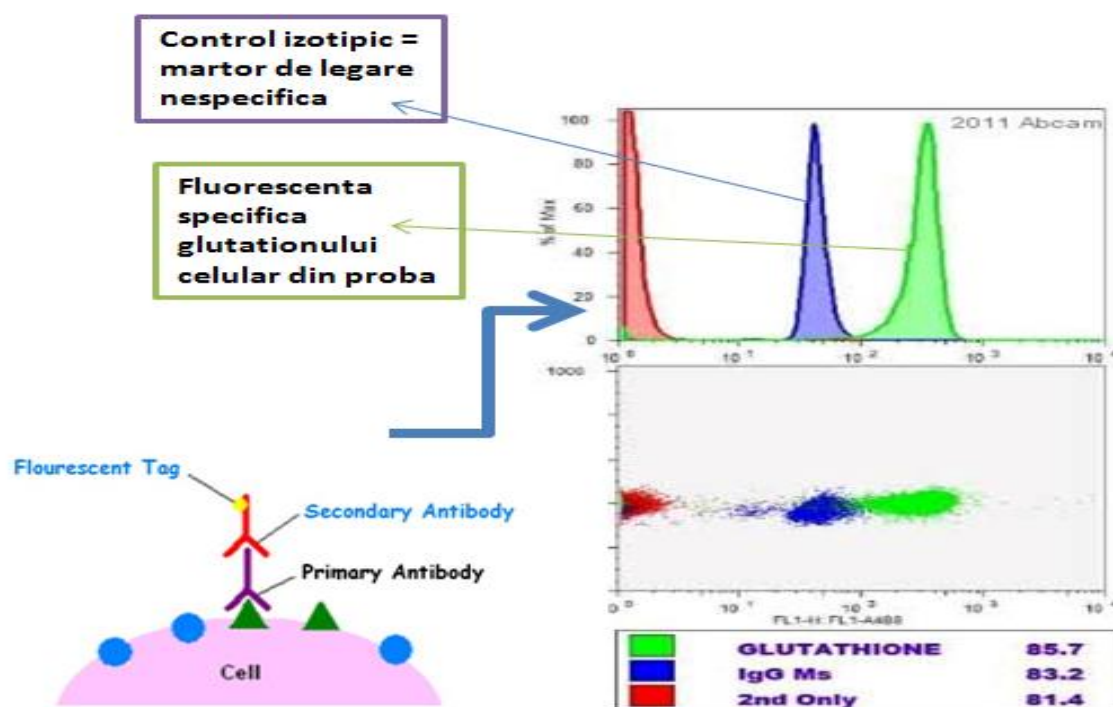


Figura 2 Evidențierea prin citometrie in flux a glutationului intracelular

c)Evaluarea prin citometrie in flux a eliberării extracelulare de citokine pro-inflamatorii (IL-6 si IL-8) de catre celulele endoteliale stimulate simultan cu TNF- α si PMA. - CITOMETRIE IN FLUX si utilizarea beads-ilor de captura – *BD Cytometric Bead Array (CBA)- Human Inflammatory Cytokines kit (BD Pharmingen)*

Kitul utilizează o serie de particule cu intensități de fluorescență discrete pentru detecția simultană a mai multor analiți solubili (citokine inflamatorii). Fiecare particulă (beads) din kit are o suprafață de captură acoperita cu anticorpi specifici pentru IL-8, IL-6 (COOK, 2001). Beads-ii de captură, anticorpii de detecție conjugați și standardele recombinante sau probele de testat sunt incubate împreună pentru a forma un complex de tip „sandwich” care se vizualizează în coordonate APC-A/PE-A în urma achiziției de citometrie în flux.

Analiza histogramelor de fluorescența si interpolarea valorilor pe curbele de calibrare se realizeaza cu **FCAP Beads Array software**.

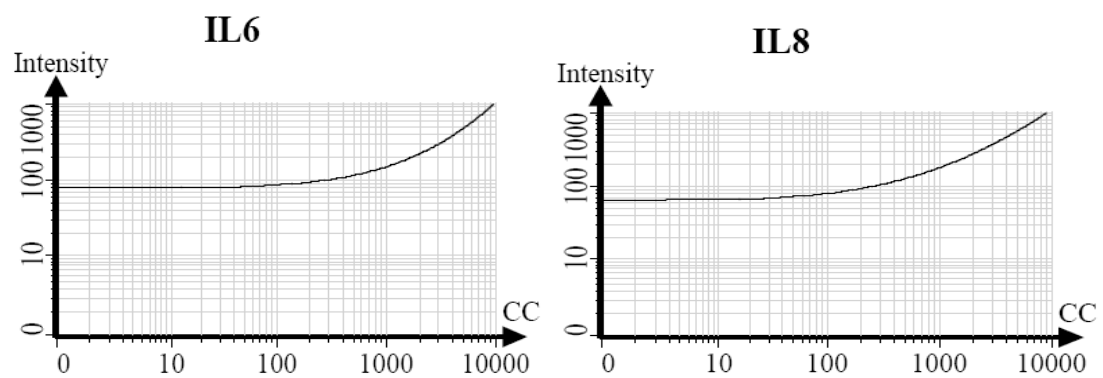
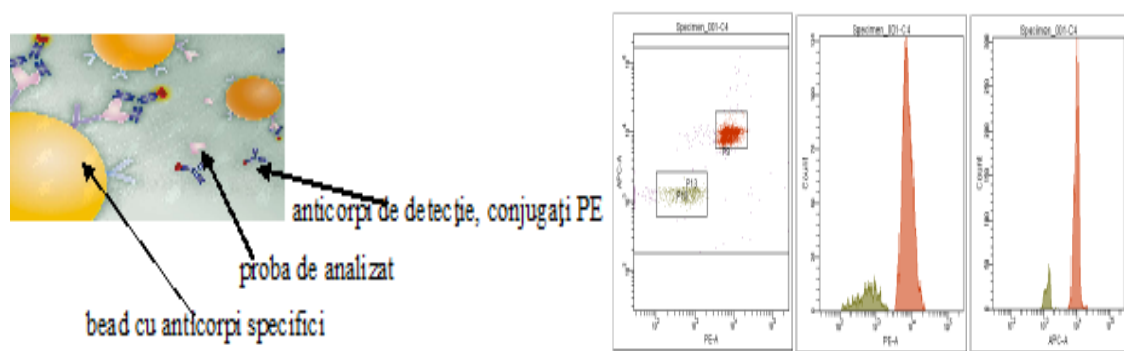


Figura 3 Evidențierea prin citometrie in flux a citokinelor extracelulare

III. REZULTATE EXPERIMENTALE

Pentru o exprimare mai facilă în cadrul descrierii experimentale și a prezentării rezultatelor vom denumi produsul rezultat din deseurile de vinificație – complex TES.

III.1. STUDII ÎN SISTEME EXPERIMENTALE ACELULARE

a) Evaluarea efectului antiradicalic/ antioxidant la nivel celular al complexului TES

Testul DPPH:

S-au preparat trei variante de extract TES în diferite medii de solubilizare, respectiv apă, etanol 70% și metanol 70%. S-a folosit drept control o soluție de 1 mg/ml Vit C în apă. Pentru fiecare probă se realizează câte un martor format din metanol, apă distilată și amestecul de interes. Rezultatele sunt prezentate ca % de inhibiție calculat cu formula:

$$\% \text{Inhibiție} = (A_{\text{DPPH}} - A_{\text{proba}}) / A_{\text{DPPH}} * 100$$

unde: A_{DPPH} – absorbanța DPPH în absența substanței de testat

Aproba – absorbanța probei minus absorbanța blank-ului ce conține proba

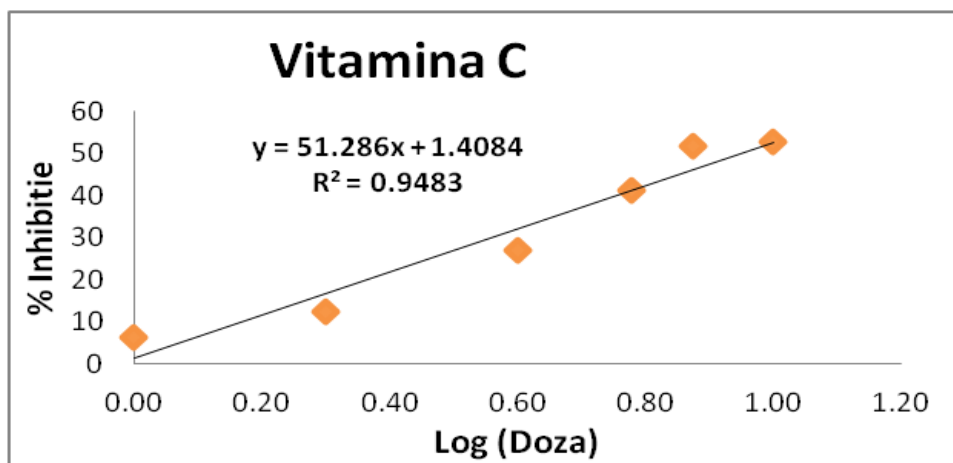


Fig.5: Curba ce calibrare cu Vitamina C (1 mg/ml)

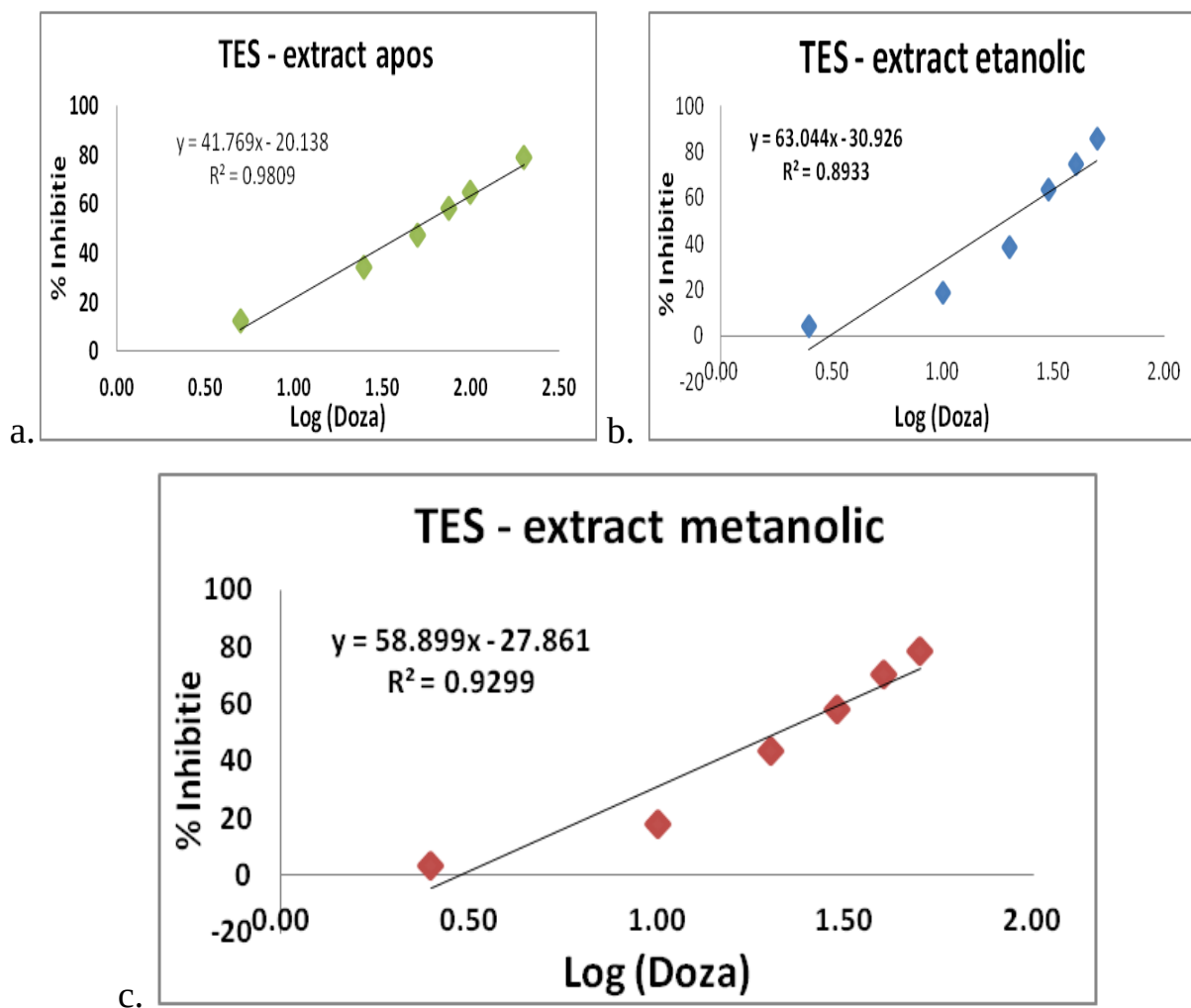


Fig.6:Reducerea radicalului DPPH in prezenta Complexului TES: a. extract apos (50 mg/ml); b. extract etanolic 70% (50 mg/ml); c. extract metanolic 70% (50 mg/ml);

b) **Capacitatea antioxidanta totala(TAS)** - a fost determinata cu kitul TAS (total antioxidant status) – RANDOX Laboratories Ltd., UK, furnizand printr-o metoda colorimetrica nivelul antioxidantilor existenti in proba necunoscuta.

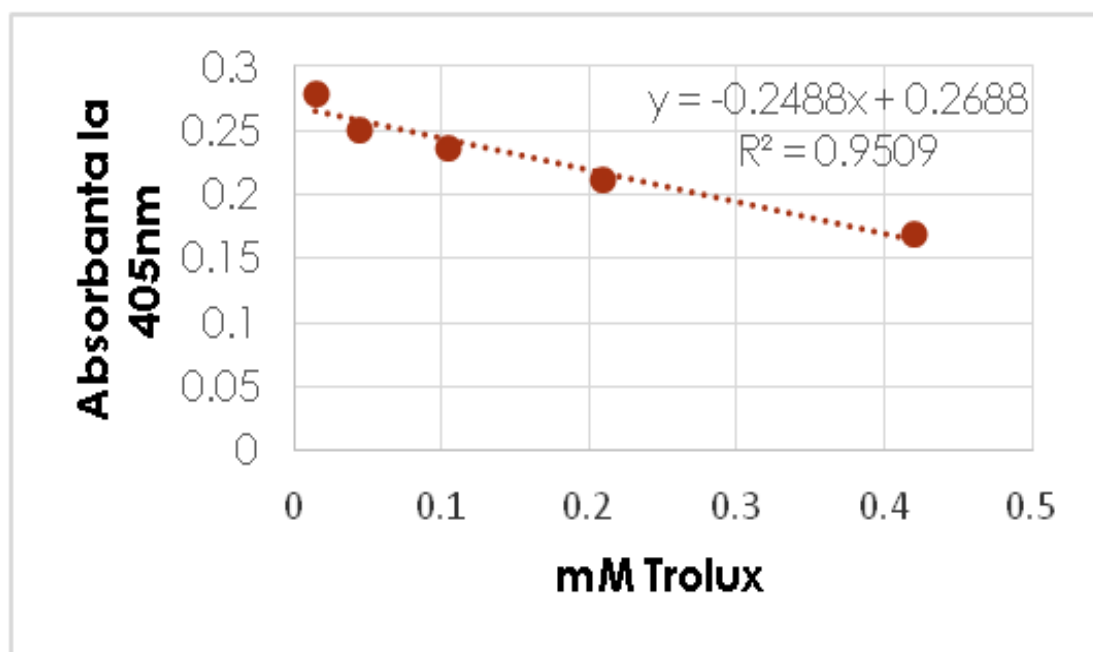


Fig.7: Curba de calibrare cu Trolox (Vitamina E sintetica)

Tabel 1: Evaluarea concentratiei totale de antioxidanti si a efectului antioxidant/antiradicalic

Proba	DPPH	TAS
	EC₅₀ (µl extract/ ml reactie)	mol/ml
TES extract apos	48	112,76
TES extract etanolic	19	282,11
TES extract metanolic	21	268,03
Vit C	10	-

In urma analizei rezultatelor s-a constatat ca cea mai buna activitate antiradicalica (cantitatea de extract necesara pentru a reduce cu 50% concentratia initiala de DPPH, EC₅₀=19 µl extract) precum si cea mai mare cantitate de antioxidanti extrasi (282.11 mlo/ml) se regaseste in extractul etanolic.

1.1. Evaluarea efectului antioxidant al extractelor TES asupra a doua enzime oxidative de faza I implicate in reducerea stresului oxidativ intracelular: catalaza - superoxid dismutaza.

a) Determinarea activitatii enzimaticice a catalazei din ficat bovin

Descompunerea H_2O_2 urmeaza initial (circa 0-30s) o reactie de ordinul intai, concentratiile de H_2O_2 situandu-se in domeniul 0.01-0.05mol/l. Constanta de viteza (k) pentru reactia globala este data de:

$$k = \frac{1}{\Delta t} * \ln \frac{[S_1]}{[S_2]} = \frac{2.3}{\Delta t} \log \frac{[S_1]}{[S_2]} \quad s^{-1}$$

unde $\Delta t = t_2 - t_1$ reprezinta intervalul de timp masurat; $[S_1]$ si $[S_2]$ reprezinta concentratiile de H_2O_2 la timpul t_1 respectiv t_2 . Constanta k poate fi utilizata ca o masura directa a concentratiei de catalaza. In studiile cu preparate enzimaticice purificate, activitatea specifica (k_1') este obtinuta prin impartirea lui k cu concentratia molară a catalazei [E].

$$k_1' = k/[E] \quad l * mol^{-1} * s^{-1}$$

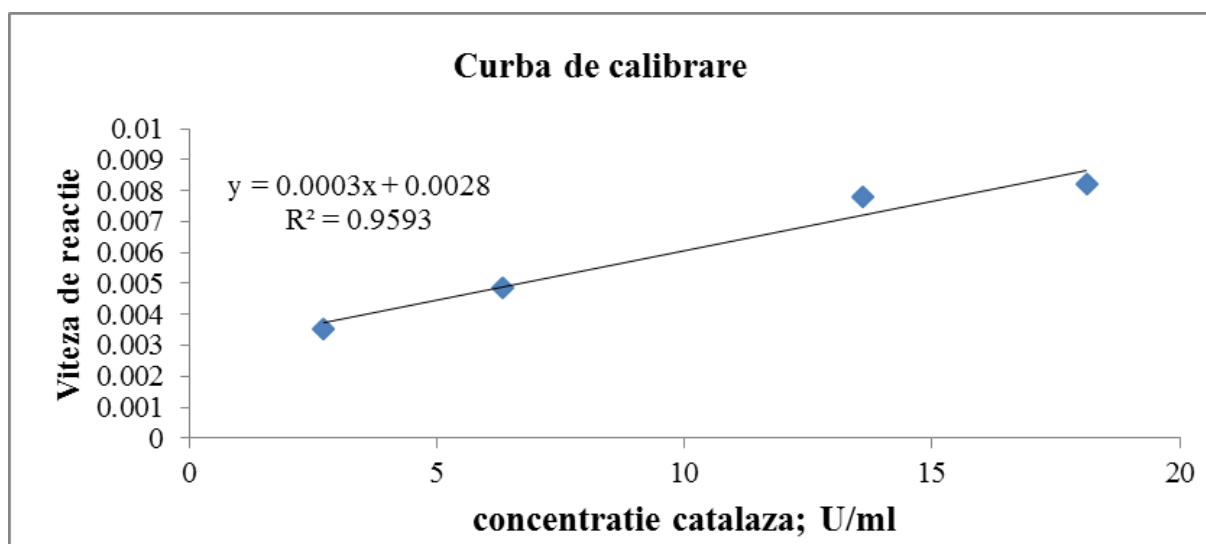


Fig.8: Curba de calibrare Catalaza

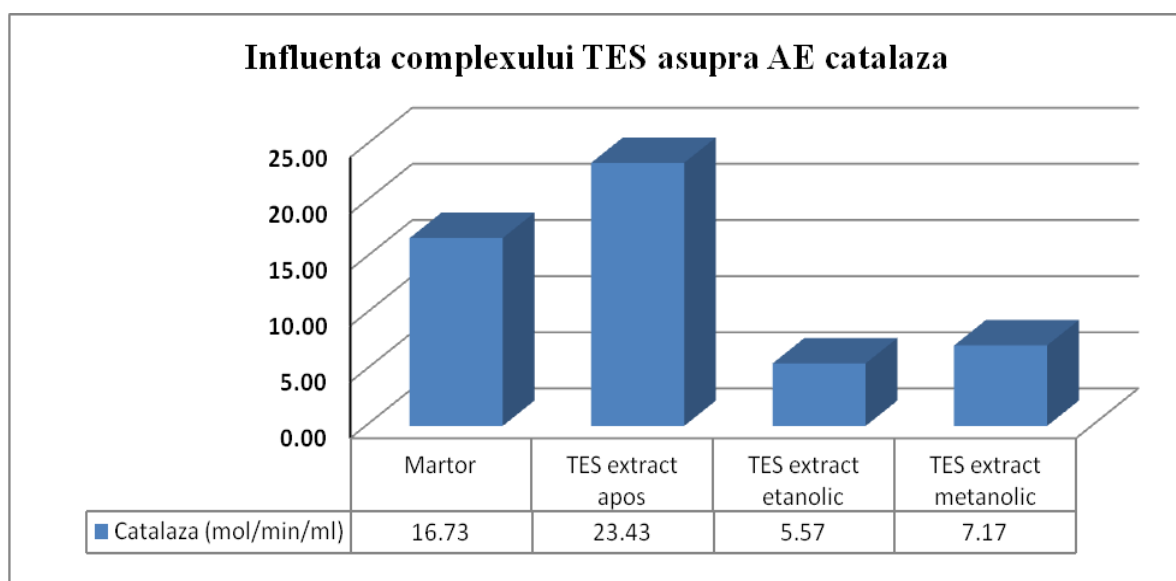


Fig.9: Efectul complexului TES asupra activitatii enzimatice a catalazei in sistem acelular

Complexul TES extract apos creste semnificativ activitatea catalazei cu 40% fata de martor, conducand astfel la eliminarea apa oxigenata din sistem. Datorita prezentei alcoolului in mediu de reactie, avem un efect fals negativ, deoarece acesta actioneaza asupra structurii cuaternare a a enzimei si o denatureaza.

b) Determinarea activitatii enzimatice a superoxid dizmutazei din eritrocite bovine

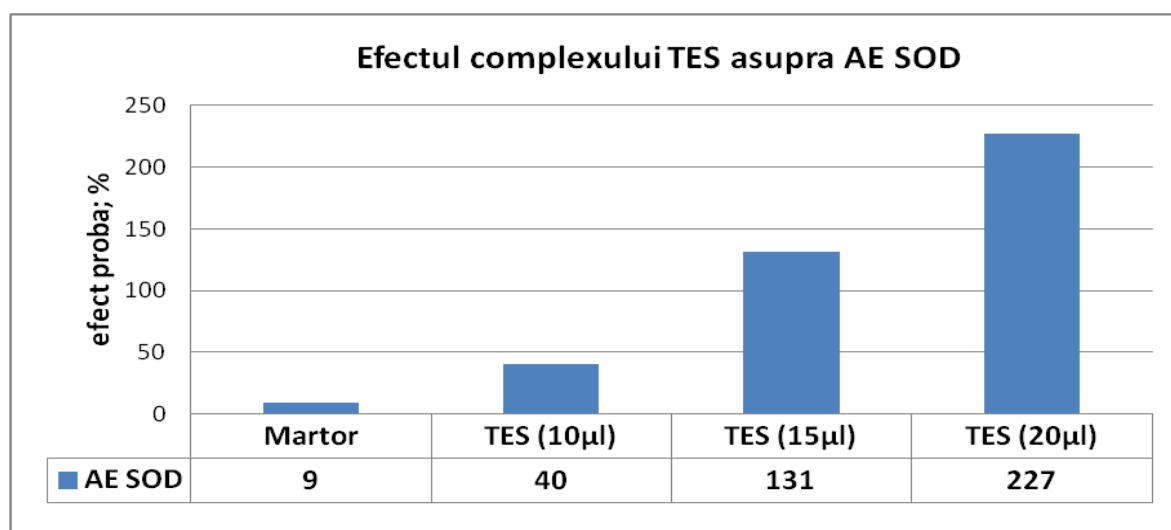


Fig.10: Variatia activitatii enzimatice a SOD in prezenta complexului TES

Complexul TES extract apos prezinta o crestere a activitatii enzimatice a SOD, in functie de doza aplicata (20 μ l extract creste cu pana la 227% AE SOD). Astfel putem spune ca TES contine un compus cu actiune activatoare asupra SOD.

III.2. STUDII „IN VITRO” PRIVIND CITOTOXICITATEA SI ACTIVITATEA ANTIOXIDANTA SI ANTIINFLAMATOARE A EXTRACTULUI TES PE LINII CELULARE UMANE NORMALE DE KERATINOCIT (HACAT) SI FIBROBLAST DERMIC(HS27)

Potentialul citotoxic si actiunea antioxidanta/ antiinflamatoare *in vitro* a fost evaluata prin testarea extractului pe doua linii celulare standardizate:

Liniile celulare utilizate in cadrul modelelor experimentale *in vitro*:

Fibroblast (linia celulara normala HS27) – celule cu capacitate proliferativa mare, culturile celulare ajung la confluenta relativ repede, in aproximativ 7 zile. In monocultura, fibroblastele formeaza clustere. La microscopul optic, celulele au un aspect elongat, fusiform, cu nucleu eliptic proeminent. Cultivarea fibroblastilor la densitati celulare foarte mari $>15 \times 10^4$ celule/cm² determina stratificarea lor si transformarea in fibrocite, celule cu dimensiuni mai mici care nu se mai divid, acest stadiu fiind reversibil. Principala functie a fibroblastelor este mentinerea integritatii structurale a tesutului conjunctiv prin sinteza componentelor matricei extracelulare si, in special, a colagenului de tip I si II. La nivel local si extrapolat la nivel sistemic, celulele sunt expuse, in conditii patologice, la stimuli exogeni/ endogeni nocivi, generatori de stres oxidativ si procese inflamatorii care contribuie la mentinerea si evolutia starii de dezechilibru homeostatic.

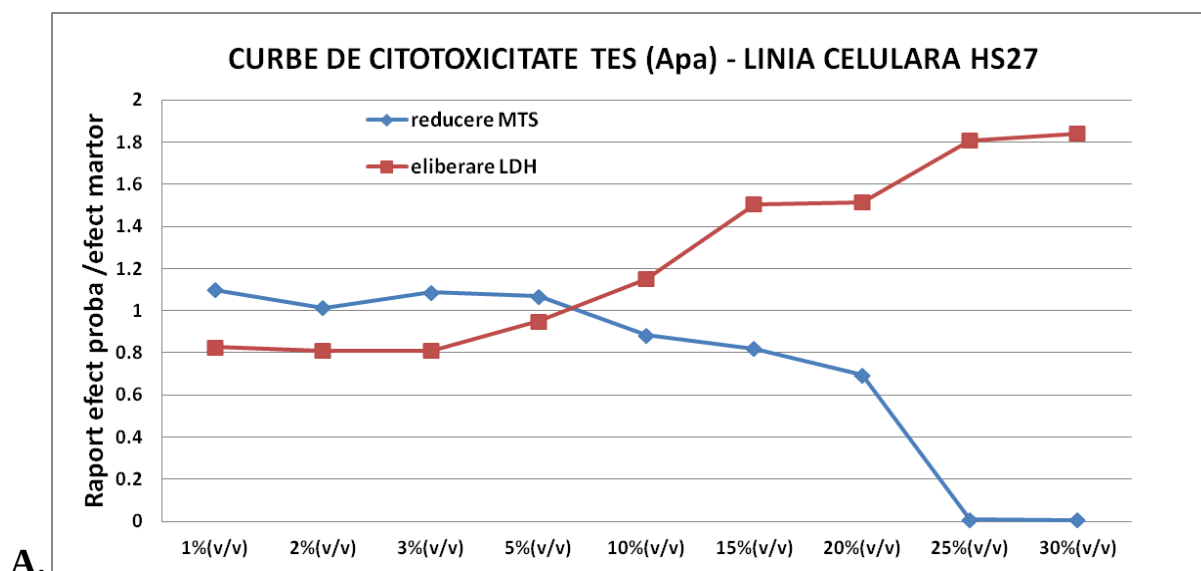
Keratinocit (HaCaT) – celule scuamoase epiteliale, cu un potential regenerativ marcant, ce sufera un proces de diferentiere pe parcursul migrarii sale de la nivelul stratului bazal germinativ pana la stratul cornos, descuamativ. Acest tip celular pastreaza caracteristicile specifice zonei din care a fost recoltat, astfel ca, in regiunea palmelor si a talpilor, acesta prezinta o structura unica, prezenta doar in aceste zone. Datorita faptului ca celulele umane nu-si modifica proprietatile in cultura, pastrandu-si capacitatea de diferentiere, dupa recoltare si cresterea pe mediul de cultura, keratinocitul poate fi transplantat in orice alta

regiune a corpului, el conservandu-si proprietatile originale, specifice locului de unde a fost prelevat.

a) Evaluarea efectului citotoxic al extractului TES prin stabilirea corelatiei dintre scaderea viabilitatii celulare (testul MTS) si cresterea activitatii enzimatic in mediul de cultura (testul LDH).

Celulele au fost lasate la aderat 24h (7000 celule/godeu) si tratate timp de 48h cu substanta de testat, conform protocolului de lucru pentru trusa de reactivi specifici (MTS/ LDH). Toate concentratiile de principiu active au fost testate in triplicat. Din valoarea medie a absorbantelor inregistrate pentru fiecare triplicat este scazuta media absorbantei blank-ului (mediu de cultura simplu, fara celule), ca ulterior valorile obtinute sa fie raportate la controlul celular (celule netratate cu substanta de interes) prelucrat in mod similar probelor, obtinandu-se astfel efectul compusului de testat asupra viabilitatii celulare (rezultatele testului MTS) si respectiv toxicitatea acestuia (rezultatele testului LDH) in functie de concentratiile folosite.

Rezultatele testelor in vitro de citotoxicitate pe linia celulara HS27:



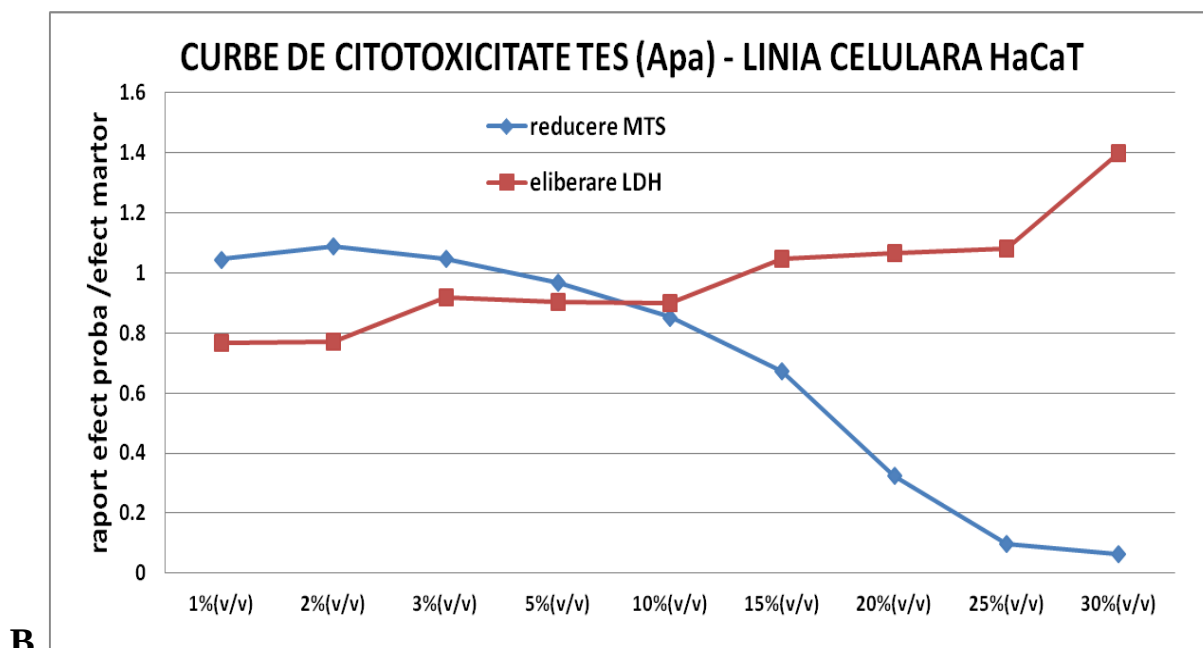


Fig. 11 : Efectul extractului TES evidentiat prin testele MTS si LDH asupra liniilor celulare testate (HS27 – fibroblasti si HaCaT - keratinocite)

Pe linia celulara HaCaT (a.), pragul de citotoxicitate este de 7,5%, de la aceasta concentratie creste cantitatea de lactat dehidrogenaza eliberata in mediu, in timp ce reducerea MTS scade indicand o pierdere a integritatii membranei celulare respectiv scaderea viabilitatii celulare. Pe linia celulara HS27 (b.), complexul TES prezinta un efect citotoxic incepand cu o concentratie de 5%. Sub aceste doze se remarca un raport superior fata de martorul celular (efect proba/ efect martor >1) al activitatii metabolice evaluata prin tehnica MTS, ceea ce sugereaza o activare a metabolismului celular indusa de componentele extractului.

b) Evaluarea stresului oxidativ intracelular prin citometrie in flux prin identificarea simultana a radicalilor oxigenati intracelulari (anion superoxid si apa oxigenata) in keratinocite stimulate simultan cu TNF- α si PMA

Analiza speciilor reactive de oxigen a fost efectuata prin flow-citometrie (FACS Canto II) utilizand markeri fluorescenti HE (dihidroetidina) si DCFH-

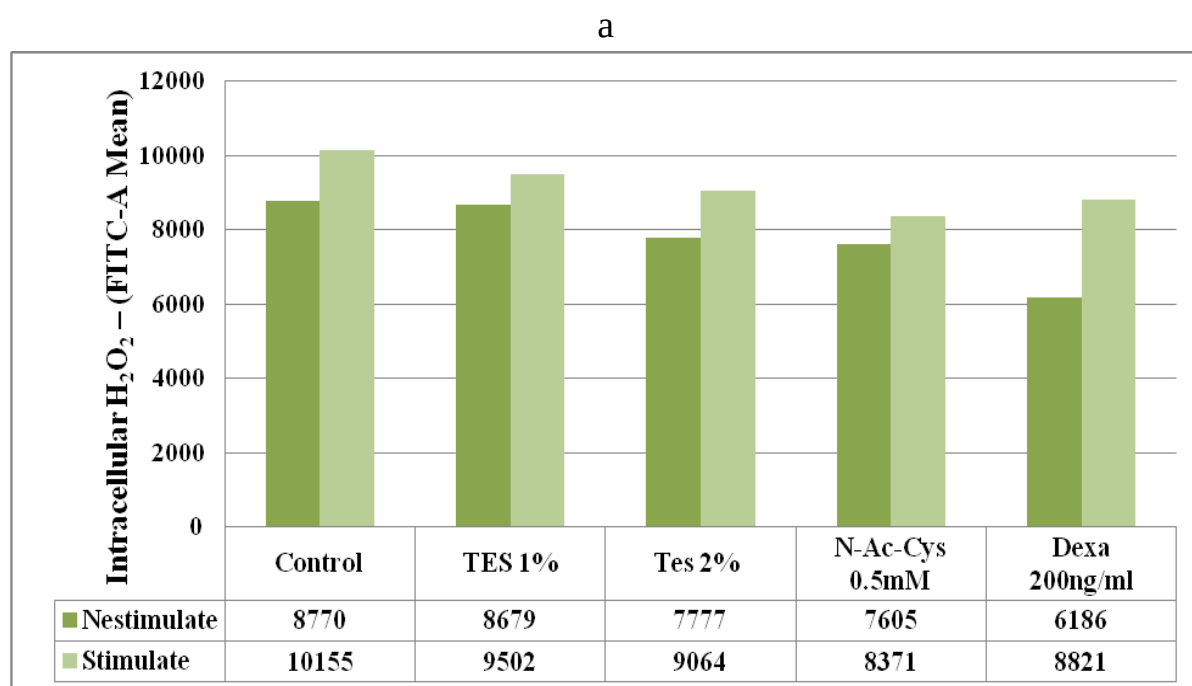
DA (2',7'-diclorfluorescein-diacetat) pentru detectia concomitenta la nivel intracelular a anionului superoxid si peroxidului de hidrogen ca specii reactive ale oxigenului.

Au fost realizate doua serii experimentale de investigare a efectului antioxidant asupra **keratinocitelor din linia celulara HaCaT**: tratare 48h in conditii normale de dezvoltare (nivel bazal al peroxidului de hidrogen, in prezenta si absenta compusilor investigati), cat si in cadrul unui model de inflamatie nespecifica indusa de tratarea cu TNF- α 15ng/ml + PMA 0.1 μ M (24h pretratare cu extract + 24h stimulare).

S-au utilizat doi compusi de comparatie:

- N-acetil-Cysteina, un precursor al L-cisteinei, ce actioneaza celular in sensul producerii de glutation, avand efect antioxidant prin aceasta cale.
- Dexametazona, un antiinflamator cunoscut, utilizat in acest sistem experimental in sensul contracararii stimulării nespecifice cu TNF α .

Rezultatele sunt prezentate in graficele de mai jos.



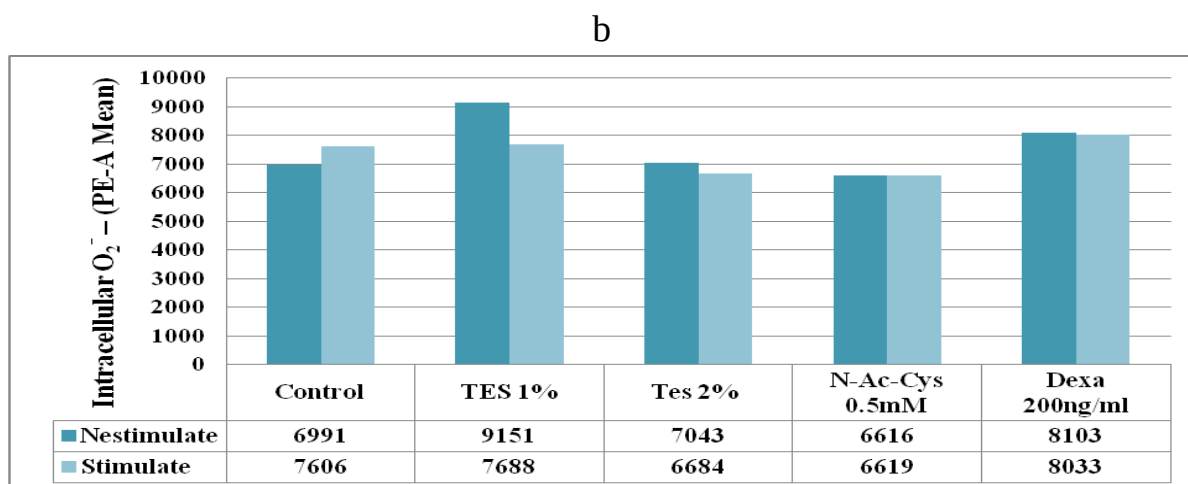


Fig. 14: Efectul TES asupra H_2O_2 si O_2^- in keratinocite (HaCaT) nestimulate/ stimulate cu $TNF-\alpha$ +PMA

Complexul TES reduce formarea de radicali liberi oxigenati atat in celulele nestimulate cat si in cele stimulate. In celulele tratate cu N-acetil-cisteina (agent antioxidant) scad ambii radicali ai oxigenului. Dexametazona, avand ca actiune principala reducerea inflamatiei, scade H_2O_2 intracelulara, dar cu acumulare de O_2^- , pentru un efect antioxidant complet fiind necesara suplimentarea cu substante ce transforma si inactiveaza anionul superoxid (ex. activatori ai superoxid-dismutazei).

c) Evaluarea activitatii enzimatice a enzimelor intracelulare (Catalaza, Superoxid dismutaza) in prezenta extractului TES.

Activitatea enzimatice a principalelor enzime antioxidante: catalaza si superoxid-dismutaza a fost evaluata din lizate celulare de keratinocit uman normal, cultivate in aceleasi conditii experimentale ca cele pentru evaluarea celor 2 radicali liberi oxigenati corespunzatori: aderare 24h, tratare 48 h si stimulare cu $TNF\alpha$ 15ng/ml si PMA 0.1 μ M. Rezultatele sunt prezentate in graficele de mai jos, ca procente de variatie a absorbantelor corespunzatoare activitatii enzimatice a probelor tratate fata de martorul celular netratat.

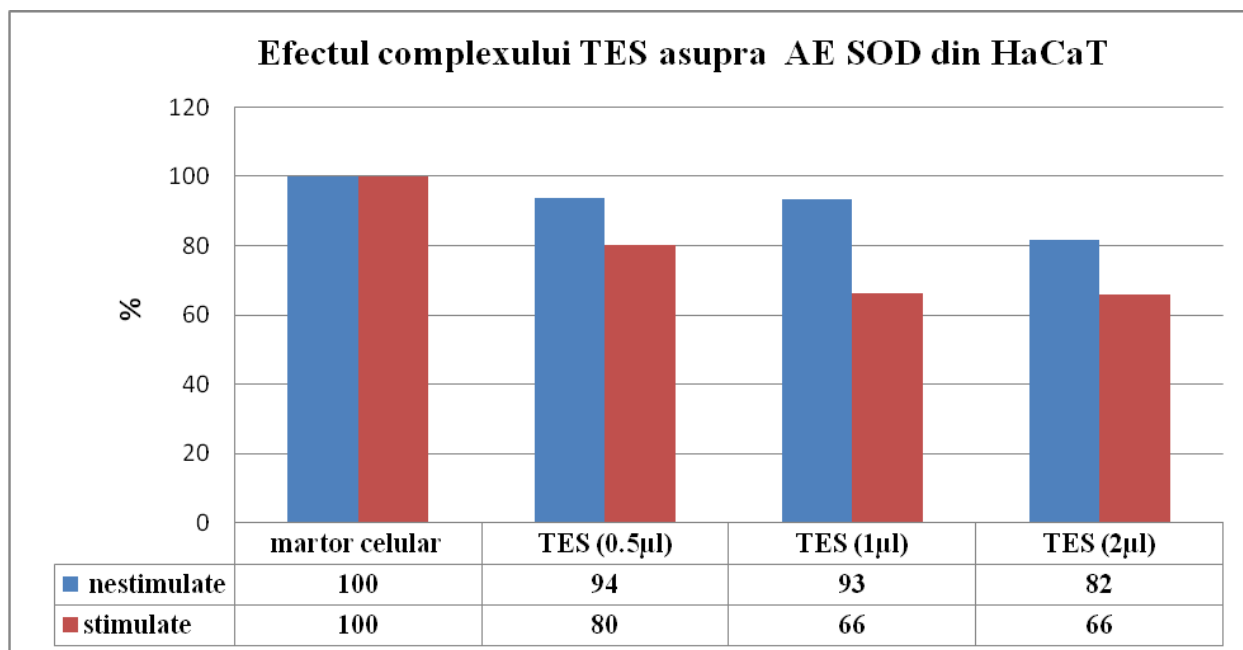


Fig. 16: Influenta complexului TES asupra activitatii enzimatice a SOD

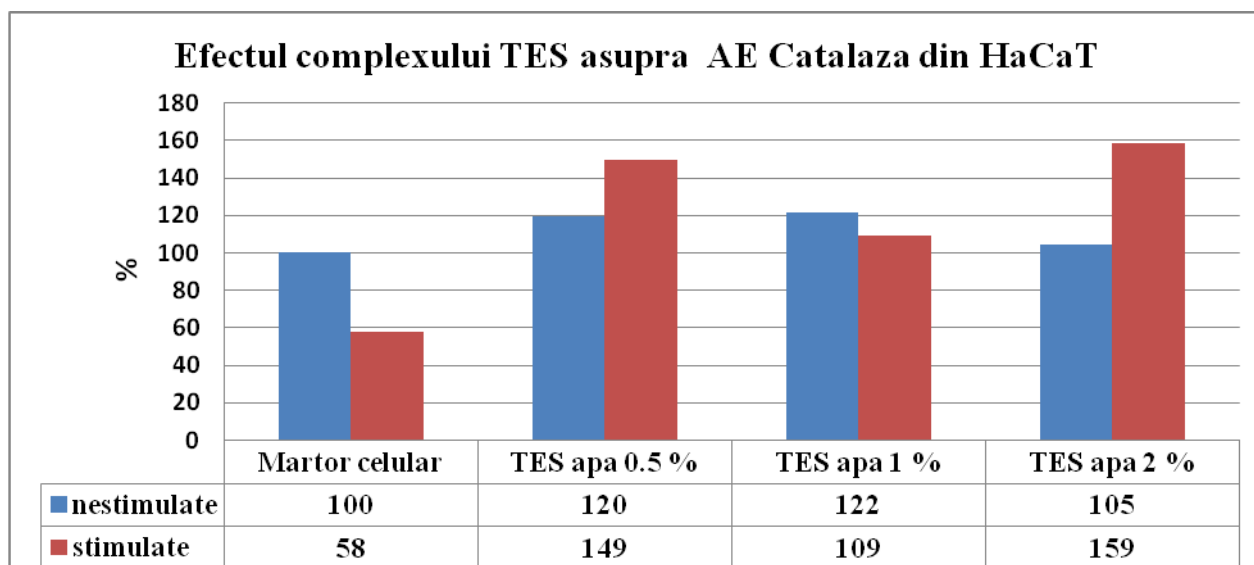


Fig. 17: Influenta complexului TES asupra activitatii enzimatice a catalazei

Efectul antioxidant al complexului TES este manifestat prin scaderea peroxidului de hidrogen, atat la nivel bazal, cat si in conditii de stimulare oxidativa, ca urmare a cresterii activitatii enzimatice a catalazei endogene.

d) Evaluarea prin citometrie in flux a glutathionului intracelular

Stimularea sistemului antioxidant intrinsec in vederea inducerii protectiei celulare la agresiunea pro-oxidanta s-a studiat pe ambele tipuri de celule dermo-epidermice, in conditii de stimulare pro-inflamatorie cu $\text{TNF}\alpha$ 15ng/ml si PMA 0.1 μM . Rezultatele sunt prezentate in graficele de mai jos. Intensitatea fluorescenta FITC-A este proportionala cu cantitatea de glutathion intracelular.

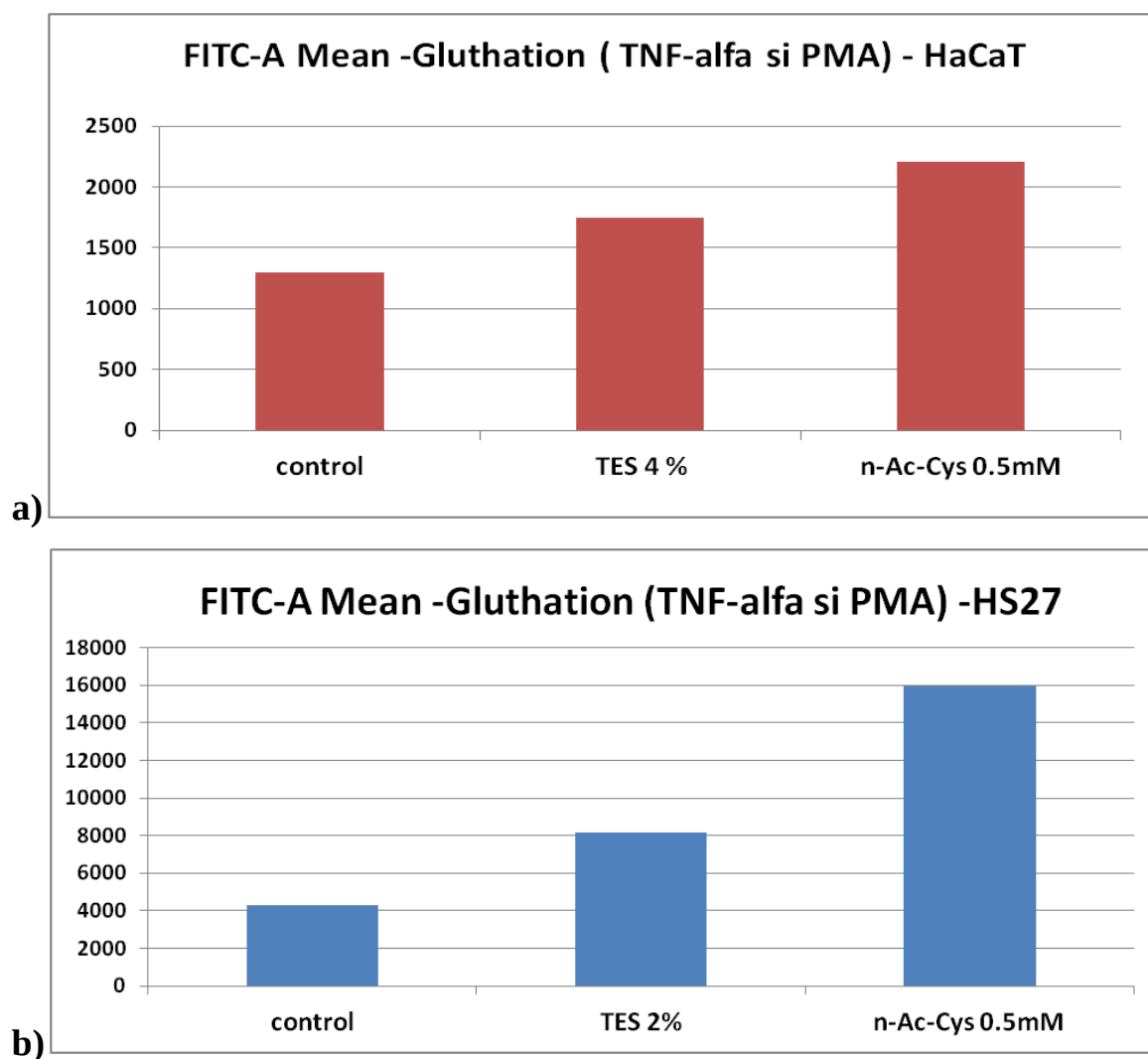


Fig. 18: Variatia glutathionului intracelular indusa de complexul TES in liniile celulare HaCaT (a) si HS-27 (b)

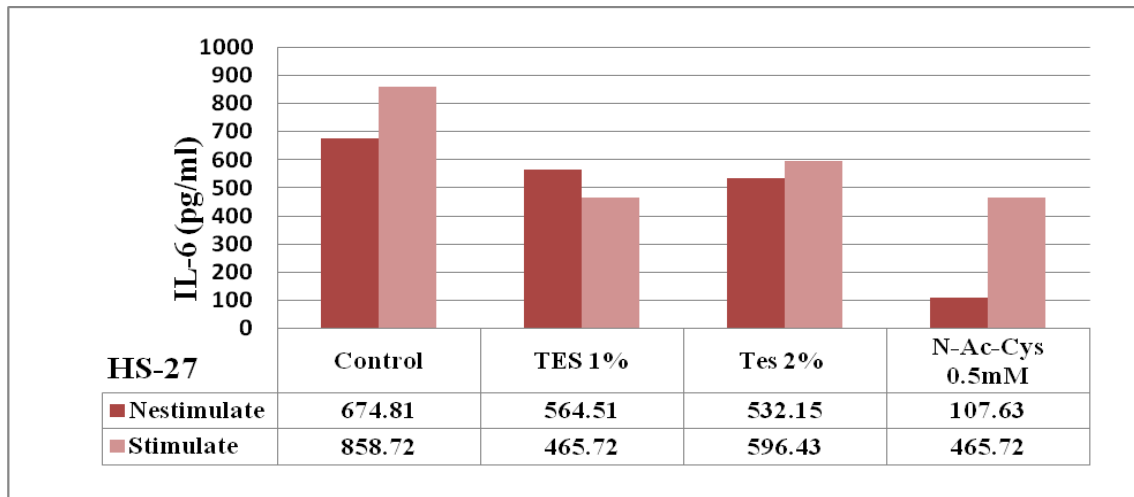
Complexul TES induce in ambele linii celulare o crestere a glutathionului celular, in acelasi sens cu martorul pozitiv N-acetil-Cisteina, demonstrand prin aceasta efect antioxidant concertat pe mai multe cai de actiune.

e) Evaluarea prin citometrie in flux a eliberarii extracelulare de citokine pro-inflamatorii (IL-6 si IL-8) de catre celulele endoteliale stimulate simultan cu TNF- α si PMA.

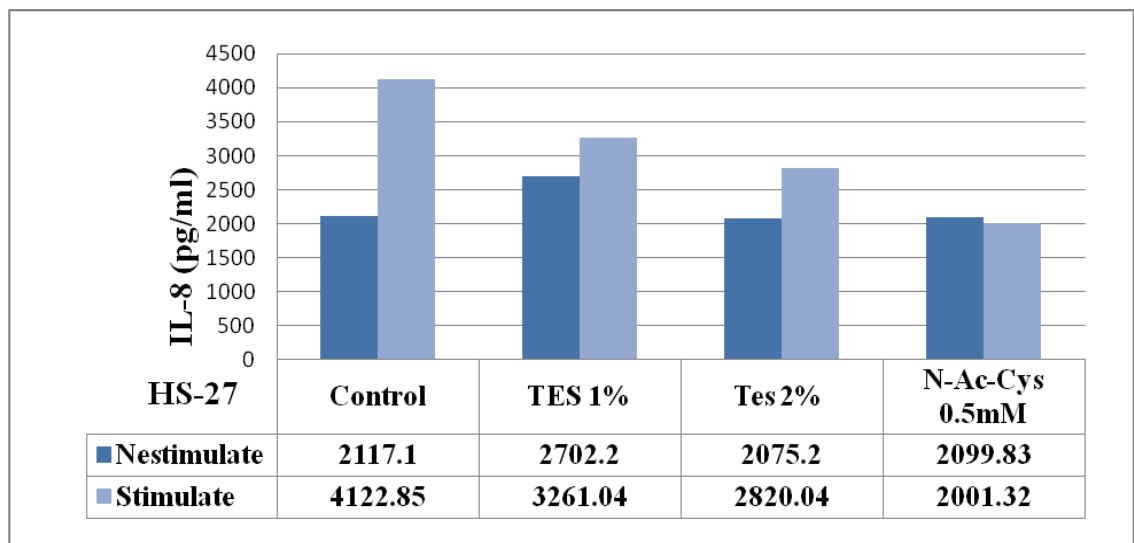
Pentru testarea efectului antiinflamator al extractelor s-au realizat urmatoarele sisteme experimentale pe culturi de fibroblasti umani si keratinocite umane din linii standardizate: detectie citokine IL6, IL8 din supernatant de cultura; conditii de stimulare pro-inflamatorie diferentiata cu PMA 0.1 μ M si TNF- α 15 ng/ml; control pozitiv N-acetil-cisteina (antioxidant) si dexametazona (antiinflamator).

In modelul experimental utilizat, efectul extractului TES a fost comparat cu NAC pe linia celulara HS27 si cu NAC si Dexametazona pe linia celulara HaCaT. Factorul de necroza tumorală (TNF- α) este o proteina de semnalizare (citokina) implicata in inflamatie sistemica si este una dintre citokinele responsabile de reactia de faza acuta. TNF- α este un regulator central al inflamatiei, iar antagonistii lui pot fi eficienti in tratarea afectiunilor inflamatorii, in care TNF- α are un rol patogenic important (Esposito, 2009). PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) cunoscut si ca 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) este un activator specific al Protein Kinase C (PKC) deci si al NF- κ B. PMA afecteaza intr-o mare masura celulele si tesuturile, fiind cunoscut ca stimulator al activitatii oxidate (DeChatelet, 1976). Rezultatele sunt prezentate in figurile de mai jos:

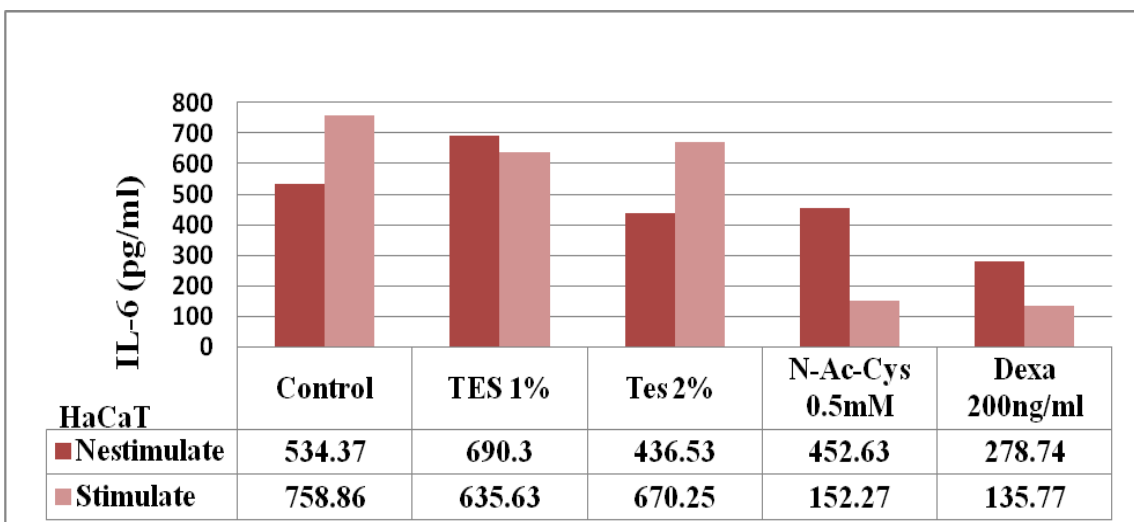
A.



B.



C.



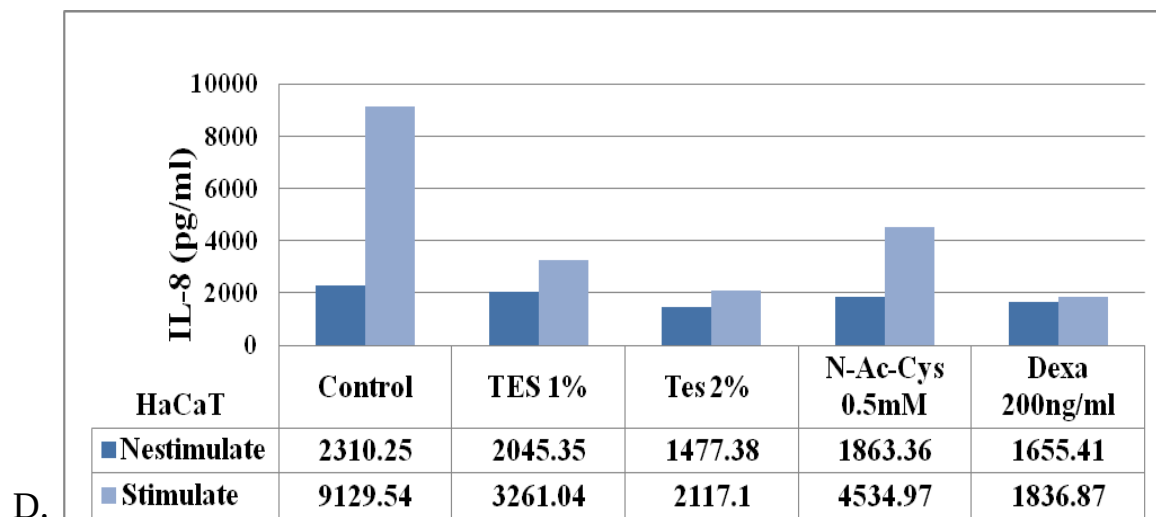


Fig. 12: Eliberare cytokine proinflamatorii (IL-6, IL-8) pe linile celulare HS-27(A, B) si HaCaT (C, D) in prezenta complexului TES

In conditii de inflamatie nespecifica prin stimulare cu PMA si $TNF\alpha$, se observa o inhibare a cytokinelor proinflamatorii in cazul celulelor tratate cu TES 2% comparativ cu martorul celular. (IL6 scade cu 69% in fibroblasti stimulati si 88% in keratinocite stimulate; IL8 scade cu 68% in fibroblasti stimulati si 23% in keratinocite stimulate).

IV. CONCLUZII

Studiile realizate in cadrul acestui proiect au demonstrat ca deseurile rezultate in procesul de vinificatie pot fi o sursa de substante bioactive convenabila din punct de vedere al raspandirii, simplitatii proceselor tehnologice de obtinere a principiilor active si valorificarii proprietatilor antioxidante si antiinflamatoare.

Testele derulate pe parcursul a 6 luni au evidentiat un profil convenabil de toxicitate pe liniile standardizate de keratinocit uman normal (HaCaT) si fibroblast dermic (HS27). Concentratiile de 7% (V/V) pentru keratinocit si 5% (V/V) pentru fibroblast reprezinta limite rezonabile de toxicitate la nivelul pielii, un prim indiciu pentru utilizarea topica in siguranta a acestui compus.

Studiile de activitate biologica specifica asupra unor mecanisme antioxidante si anti-inflamatoare au definit urmatoarele **efecte ale complexului TES** izolat din deseuri rezultate in procesul de vinificatie:

- **Antioxidant pe cai de actiune convergente**, dupa cum urmeaza:
 - efect antiradicalic demonstrat de **reducerea DPPH** pentru extractele apoase, metanolice si etanolice;
 - **status antioxidant global** evidentiat prin reducerea radicalului ABTS;
 - **activarea in sistem acelular** a principalelor enzime oxidative de faza I implicate in reducerea stresului oxidativ: **catalaza - superoxid dismutaza**;
 - **reducerea intracelulara in keratinocite si fibroblasti stimulate pro-inflamator a principalelor specii reactive de oxigen (H_2O_2 si O_2^-)**, corelata cu modularea activitatii enzimactice a **catalazei si superoxid-dismutazei celulare**.
 - **activarea glutatyonului celular** in keratinocite stimulate pro-inflamator, similara cu martorul pozitiv N-Acetil-Cysteina.

•**Antiinflamator prin inhibitia principalelor citokine mediatoare** de faza acuta (**IL6**) si responsabile de propagarea inflamatiei prin recrutarea neutrofilelor la situsul inflamator (**IL8**), la nivel de keratinocit si fibroblast stimulat cu $\text{TNF}\alpha$ si PMA.

Rezultatele obtinute in cadrul acestui proiect, sunt date preliminariei privind optimizarea bioproduselor si destinatia lor catre terapeutica. Pe de-o parte, au fost stabilite tehnologii experimentale de obtinere a unor biocomplexe tinta si pe de alta parte au fost stabilite modele experimentale relevante pentru tematica propusa, dintre care unele au fost aplicate si realizate pentru determinarea activitatii biologice a compusilor secundari ai prelucrarii strugurilor. Desi exista un interes deosebit pentru bioprodusele pe baza de componente din struguri si chiar pentru valorificarea deseurilor este necesara o baza stiintifica argumentata pentru utilizarea ca resurse de materii prime farmaceutice.

Avand in vedere rezultatele studiilor privind efectele biologice la nivel celular, se impune continuarea cercetarii intr-un proiect stiintific care sa aprofundeze experimental actiunea deseurilor de struguri in anumite asocieri cu alte extracte care sa potenteze eficienta:

SINERGISME DE ACTIUNE BIOLOGICA „IN VITRO” IN PROCESE PROLIFERATIVE CUTANATE CU APLICABILITATE IN DEZVOLTAREA DE BIOPRODUSE.

Aceasta se poate concretiza in continuarea screeningului anterior realizat pentru principii active din deseuri de vinificatie pentru care s-a demonstrat efectul antioxidant si completarea cu actiunea in vitro a unor complexe extractive din alte specii de plante in scopul valorificarii integrale a acestor resurse in dezvoltarea de produs farmaceutic.

BIBLIOGRAFIE

- [1] Agustin-Salazar s., Medina-Juárez L.A., Soto-Valdez H., Manzanares-López F., Gámez-Meza N., Influence of the solvent system on the composition of phenolic substances and antioxidant capacity of extracts of grape (*Vitis vinifera* L.) marc, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2014, 20, 208–213.
- [2] Korkina L., Kostyuk V., de Luca C., Pastore S., Plant phenylpropanoids as emerging anti-inflammatory agents, *Mini Rev. Med. Chem.*, 2011, 11, 823–835.
- [3] Georgiev V., Ananga A., Tsoleva V., Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals, *Nutrients*, 2014, 6, 391-415
- [4] Malich G., Markovic B., Winder C., The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines, *Toxicology*, 1997, 124(3), 179-92.
- [5] Barltrop J.A. et al. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1991, 1, 611–4.
- [6] Riss T.L., Moravec R.A., Comparison of MTT, XTT, and a novel tetrazolium compound for MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays. *Mol. Biol. Cell (Suppl.)*, 1992, 3, 184a.
- [7] Fotakis G., Timbrell J.A., In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology Letters*, 2006, 160, 171-177.

- [8] Allen M., Millett P., Dawes E., Rushton N., Lactate dehydrogenase activity as a rapid and sensitive test for the quantification of cell numbers in vitro, *Clin Mater.*, 1994, 16(4):189-94.
- [9] Decker T., Lohmann-Matthes M.L., A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity, *J Immunol Meth*, 1988, 115:61-9.
- [10] Cory A.H., Owen T.C., Barltrop J.A., Cory J.G., Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture, *Cancer Commun.*, 1991, 3, 207-12.
- [11] Cook E.B., Stahl J.L., Lowe L., Chen R., Morgan E., Wilson J., Varro R., Chan A., Graziano F.M., Barney N.P., Simultaneous measurement of six cytokines in a single sample of human tears using microparticle-based flow cytometry: allergics vs. non-allergics, *Journal of Immunological Methods*, 2001, 254, (1–2), 109-118.
- [12] Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S., The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2011, 1813, 5, 878-888.
- [13] Wilmer J.L., Luster M.I., Chemical induction of interleukin-8, a proinflammatory chemokine, in human epidermal keratinocyte cultures and its relation to cytogenetic toxicity, *Cell Biology and Toxicology*, 1995; 11, 37-50.
- [14] Bickel M., The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation, *J Periodontol.*, 1993, 64, 456-60
- [15] Esposito E., Cuzzocrea S., TNF-alpha as a therapeutic target in inflammatory diseases, ischemia-reperfusion injury and trauma, *Curr Med Chem.*, 2009,16(24):3152-67.

[16] DeChatelet L.R., Shirley P.S., Johnston R.B. Jr., Effect of phorbol myristate acetate on the oxidative metabolism of human polymorphonuclear leukocytes, Blood. 1976, 47(4):545-54.

COLECTIVUL IMPLICAT IN REALIZAREA PROIECTULUI:

1. **Prof. Univ. Dr. CS I Natalia Rosoiu** – director de proiect, Membru Titular AOSR
2. **CSI. Dr. Laura Olariu** - Membru Asociat AOSR
3. **CSIII Dr. Brandusa Dumitriu**
4. **CS. Drd. Luiza Maria Craciun**
5. **Drd. Adil Abdi**

DISEMINAREA REZULTATELOR:

1. *Valorificarea unor deșeuri vegetale din Solanum sp. și struguri ca surse de componente active antioxidante și antiinflamatoare*, Luiza Mariana Craciun, Brindusa Dumitriu, Manuela Diana Ene, Abdi Adil, Laura Olariu, Natalia Rosoiu – prezentare la **Sesiunea Stiintifica de Toamna a AOSR, Timisoara, septembrie 2017**

2. *Obtinerea unui produs bogat in substante antioxidante, in special Rezveratrol, din soiurile de struguri rosii*, Abdi ADIL, Georgeta Beleniuc, Laura Olariu, Brindusa Dumitriu, Luiza Mariana Craciun, Natalia Rosoiu, – prezentare la **Sesiunea Stiintifica de Toamna a AOSR, Timisoara, septembrie 2017**

3. *Valorification of grape marc by obtaining bioactive complexes tested through in vitro experimental models*, Luiza M. Crăciun, Brandusa G. Dumitriu, Diana M. Ene, Abdi Adil, Laura Olariu, Natalia Rosoiu – **lucrare in curs de publicare in Analele AOSR, nr.2/2017**

4. *Antioxidant effect of a vegetal grape waste complex, demonstrated in relevant dermal and epidermal cellular systems*, Luiza M. CRĂCIUN, Brandusa G. DUMITRIU, Laura OLARIU, Diana M. ENE, Natalia ROSOIU - **lucrare in curs de redactare pentru publicare in Romanian Biotechnology Letters**