

**UNIVERSITATEA „ȘTEFAN CEL MARE” DIN SUCEAVA
FACULTATEA DE INGINERIE ALIMENTARĂ
Domeniul Ingineria Produselor Alimentare**

**TEZĂ DE DOCTORAT
- REZUMAT -**

Coordonator științific,
Prof. univ. dr. ing. Gheorghe GUTT

Doctorand,
Ing. Alina Lenuța CRĂCIUN

Suceava
2023

UNIVERSITATEA "ȘTEFAN CEL MARE" DIN SUCEAVA
FACULTATEA DE INGINERIE ALIMENTARĂ
Domeniul Ingineria Produselor Alimentare

CERCETĂRI ȘI CONTRIBUȚII PRIVIND
FOLOSIREA DEȘEURILOR VITICOLE LA
OBȚINEREA RESVERATROLULUI DE ÎNALTĂ
PURITATE DESTINAT INDUSTRIEI ALIMENTARE
ȘI CELEI DE MEDICAMENTE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Coordonator științific,
Prof. univ. dr. ing. Gheorghe GUTT

Doctorand,
Ing. Alina Lenuța CRĂCIUN

Suceava
2023

Mulțumiri

Cu ocazia finalizării studiilor de doctorat și a acestei teze doresc să adresez mulțumiri coordonatorului meu științific, domnului ***prof. univ. dr. ing Gheorghe GUTT*** pentru îndrumarea și sprijinul acordat pe toată durata stagiului doctoral.

Adresez cuvinte de mulțumire membrilor comisiei de îndrumare, doamnei ***prof. univ. dr. ing. Sonia AMARIEI***, domnului ***prof. univ. dr. ing. Mircea-Adrian OROIAN*** și doamnei ***prof. univ. dr. ing. Silvia MIRONEASA*** pentru recomandările și sfaturile pe care mi le-au acordat pe tot parcursul elaborării tezei de doctorat. De asemenea, adresez mulțumiri către întregul colectiv al Facultății de Inginerie Alimentară și colegilor de doctorat care m-au susținut și încurajat permanent.

Țin să mulțumesc în mod special ***mamei mele Lucica*** pentru sprijinul moral, material, sacrificiul și răbdarea oferită. Mulțumesc pentru faptul că mereu a crezut în mine și m-a susținut necondiționat.

Alina Lenuța Crăciun

CUPRINS

Listă de abrevieri

Scopul și obiectivele tezei de doctorat

Capitolul I. Studiul și analiza stadiului actual privind caracterul antioxidant avansat al resveratrolului și metode performante de obținere a acestuia

- 1.1. Etapele dezvoltării suplimentelor de resveratrol
- 1.2. Efectele benefice ale resveratrolului asupra sănătății
 - 1.2.1. Încetinirea procesului de îmbătrânire
 - 1.2.2. Puterea antioxidantă a resveratrolului
 - 1.2.3. Inhibarea unor enzime responsabile de îmbătrânirea și pigmentarea pielii
 - 1.2.4. Efectele antibacteriene ale resveratrolului
 - 1.2.5. Efectele antifungice ale resveratrolului
 - 1.2.6. Activitatea antiinflamatorie
 - 1.2.7. Efectul anticancerigen
 - 1.2.8. Efectele cardioprotective ale resveratrolului
 - 1.2.9. Protecția împotriva bolilor sistemului nervos
 - 1.2.10. Efectele benefice asupra simptomelor diabetului
- 1.3. Valorificarea deșeurilor de viță de vie pentru extracția resveratrolului
 - 1.3.1. Surse de resveratrol
 - 1.3.2. Conținutul de resveratrol din deșeurile de viță de vie
 - 1.3.3. Prelucrarea deșeurilor de viță de vie în vederea îmbunătățirii conținutului de resveratrol
- 1.4. Extracția resveratrolului din deșeuri de viță de vie
 - 1.4.1. Clasificarea metodelor de extracție a resveratrolului din deșeuri viticole
 - 1.4.1.1. Metode clasice de extracție a antioxidanților din materii vegetale
 - 1.4.1.2. Tehnici alternative de extracție a antioxidanților
 - 1.4.2. Optimizarea metodelor de extracție a resveratrolului din deșeuri viticole
- 1.5. Metode analitice de determinare a resveratrolului din deșeuri viticole
 - 1.5.1. Cromatografia de lichide
 - 1.5.1.1. Tehnica de preparare a probelor
 - 1.5.1.2. Metode de derivatizare
 - 1.5.2. Electroforeza capilară (CE)
 - 1.5.3. Gaz-cromatografia
- 1.6. Tehnici potențiale și abordări pentru dezvoltarea unei metode de purificare a resveratrolului din deșeuri viticole

Capitolul II. Cercetări experimentale privind analiza conținutului de resveratrol din vinurile comerciale românești

- 2.1. Introducere
- 2.2. Materiale și metode
 - 2.2.1. Probe de vin
 - 2.2.2. Metoda de analiză prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)
- 2.3. Rezultate și discuții

Capitolul III. Cercetări experimentale privind analiza conținutului de resveratrol din deșeuri de viță de vie de diferite soiuri

- 3.1. Introducere
- 3.2. Materiale și metode
 - 3.2.1. Probe de lăstari de viță de vie
 - 3.2.2. Colectarea și prelucrarea probelor
- 3.3. Rezultate și discuții

- 3.3.1. Randamentul extracției cu solvent
- 3.3.2. Influența timpului de păstrare asupra conținutului de resveratrol
- 3.3.3. Influența perioadei de colectare
- 3.3.4. Influența varietății
- 3.3.5. Potențialul lăstarilor de viță de vie ca materie primă pentru extracția

resveratrolului

Capitolul IV. Cercetări experimentale privind studiul variației conținutului de *trans*-resveratrol și determinarea conținutului de polifenoli totali și a activității antioxidante din deșeuri de viță de vie

- 4.1. Introducere
- 4.2. Materiale și metode
 - 4.2.1. Probe de deșeuri de viță de vie
 - 4.2.2. Colectarea și prelucrarea probelor
 - 4.2.3. Metoda de analiză prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)
 - 4.2.4. Determinarea conținutului total de polifenoli
 - 4.2.5. Determinarea activității antioxidante prin metoda DPPH
 - 4.2.6. Analiza statistică
- 4.3. Rezultate și discuții

4.3.1. Analiza variației conținutului de resveratrol, a conținutului total de polifenoli și a activității antioxidante în frunze, cârcei și lăstari de viță de vie

4.3.2. Creșterea concentrației resveratrolului în timpul depozitării post-tăiere

4.3.3. Conținutul total de polifenoli

4.3.4. Activitatea antioxidantă prin metoda DPPH

4.3.5. Influența secționării probelor asupra creșterii *trans*-resveratrolului, a conținutului total de polifenoli și a activității antioxidante

Capitolul V. Cercetări experimentale privind optimizarea parametrilor de extracție a *trans*-resveratrolului din deșeuri viticole

- 5.1. Introducere
- 5.2. Materiale și metode
 - 5.2.1. Probe de lăstari de viță de vie
 - 5.2.2. Colectarea și pregătirea probelor
 - 5.2.2.1. Selectarea solventului
 - 5.2.2.2. Raportul solid/lichid
 - 5.2.2.3. Timpul de macerare
 - 5.2.2.4. Selectarea granulozității
 - 5.2.2.5. Numărul de extracții pe același material vegetal
 - 5.2.3. Metoda de analiză prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)
 - 5.2.4. Analiza statistică
- 5.3. Rezultate și discuții
 - 5.3.1. Selectarea tipului de solvent
 - 5.3.2. Raportul solid/lichid
 - 5.3.3. Timpul de macerare
 - 5.3.4. Selectarea dimensiunii particulelor
 - 5.3.5. Numărul de extracții pe același material
 - 5.3.6. Optimizarea parametrilor de extracție

Capitolul VI. Extracția resveratrolului prin tratamentul acid și alcalin

- 6.1. Introducere
- 6.2. Materiale și metode
 - 6.2.1. Recoltarea și prelucrarea probelor
 - 6.2.2. Tratamentul acid și tratamentul alcalin

6.2.3. Metoda de analiză prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)

6.2.4. Analiza statistică

6.3. Rezultate și discuții

Capitolul VII. Metode de pre-purificare a extractului de lăstari de viță de vie

7.1. Introducere

7.2. Materiale și metode

7.2.1. Colectarea și prelucrarea probelor

7.2.2. Spălarea extractului cu bicarbonat de sodiu

7.2.3. Extracția apoasă ca metodă de pre-purificare

7.2.4. Extracția resveratrolului cu benzoat de benzil

7.2.5. Metoda de analiză prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)

7.3. Rezultate și discuții

7.3.1. Spălarea extractului cu bicarbonat de sodiu

7.3.2. Extracția apoasă ca metodă de pre-purificare

7.3.3. Extracția resveratrolului cu benzoat de benzil

Capitolul VIII. Metode de purificare avansată cu materiale specializate a extractelor de lăstari de viță de vie

8.1. Introducere

8.2. Materiale și metode

8.2.1. Probe

8.2.2. Extractul pre-purificat

8.2.3. Purificarea cu Silicagel G60

8.2.4. Purificarea pe coloană cu rășini hidrofobe Amberlite XAD 2 și XAD 16

8.2.5. Optimizarea ciclurilor de spălare pe coloana cu rășină Amberlite XAD 2

8.2.6. Optimizarea raportului extract/material de coloană

8.2.7. Purificarea pe coloană cu Sephadex LH-20

8.2.8. Metoda de analiză prin cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)

8.2.9. Analiza statistică

8.3. Rezultate și discuții

8.3.1. Purificarea cu Silicagel G60

8.3.2. Purificarea pe coloană cu rășini hidrofobe nefuncționalizate Amberlite XAD 2 și XAD 16

8.3.3. Optimizarea ciclurilor de spălare pe coloană cu rășină Amberlite XAD 2

8.3.4. Optimizarea raportului extract/material de coloană

8.3.5. Purificarea pe coloană cu Sephadex LH-20

Concluzii generale

Diseminarea rezultatelor cercetărilor

Bibliografie

Listă de abrevieri

ADN – acid dezoxiribonucleic
ASE – extracție accelerată cu solvent
BHA – hidroxianisol-butilat
BHT – hidroxitoluen-butilat
BSTFA – bistrifluoracetamidă
CE – electroforeză capilară
CLO – organism asemănător *Campylobacter*-ului
C4H – cinamat-4-hidroxilază
DAD – Diode Array Detector
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EC – extracție convențională
GC – gaz-cromatografie
HDL – lipoproteine cu densitate mare
HPLC – cromatografie de lichide de înaltă performanță
LDL – lipoproteine cu densitate scăzută
MAE – extracție asistată cu microunde
PAL – fenilalanina-amoniac-liază (enzimă)
PDMS – polidimetisiloxan
PTFE – politetrafluoretilenă
RO – osmoză inversă
SWE – extracție apoasă supracritică
UPLC – cromatografie lichidă ultraperformantă
UV – (raze) ultraviolete
4CL – 4-cumaratul: CoA ligază

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT

Scopul tezei de doctorat constă în extracția și purificarea resveratrolului din deșeurile de viță de vie în vederea obținerii unui preparat de resveratrol de puritate înaltă destinat industriei alimentare și celei de medicamente.

Cercetările realizate în vederea îndeplinirii scopului propus au vizat următoarele obiective:

- Realizarea unui studiu al literaturii de specialitate referitor la stadiul actual al cercetărilor cu privire la metodele de extracție și purificare a resveratrolului din deșeuri viticole.
- Studiarea și analizarea deșeurilor de viță de vie din diferite soiuri recoltate în perioade diferite în vederea determinării factorilor care influențează concentrația de resveratrol.
- Determinarea modului de creștere a concentrației de resveratrol în lăstarii de viță de vie în perioada post-tăiere.
- Optimizarea parametrilor de extracție a resveratrolului din lăstarii de viță de vie în vederea stabilirii parametrilor optimi ce vor genera randamentul cel mai mare.
- Dezvoltarea și testarea unor metode și materiale specializate destinate purificării resveratrolului din extractele obținute.

Cuvinte cheie:

Resveratrol, lăstari de viță de vie, extracție, purificare, suplimente alimentare

Teza de doctorat intitulată „CERCETĂRI ȘI CONTRIBUȚII PRIVIND FOLOSIREA DEȘEURILOR VITICOLE LA OBTINEREA RESVERATROLULUI DE ÎNALTĂ PURITATE DESTINAT INDUSTRIEI ALIMENTARE ȘI CELEI DE MEDICAMENTE” cuprinde un număr de 8 capitole, în care ultimul capitol este destinat *Concluziilor generale*, listă de abrevieri, referințe bibliografice și o listă de lucrări publicate sau susținute la manifestări științifice din țară și din străinătate.

Capitolul I prezintă *Studiul și analiza stadiului actual privind caracterul antioxidant avansat al resveratrolului și metode performante de obținere a acestuia.*

1.1. Etapele dezvoltării suplimentelor de resveratrol

Resveratrolul (3,4',5-trihidroxistilbenă) este un compus fenolic natural de origine vegetală. Acesta aparține categoriei stilbenelor, care sunt metaboliți secundari ai plantelor cu un „schelet de stilbenă” care cuprinde două inele aromatice legate de o alchenă (figura 1.2) [Pi,'18a]

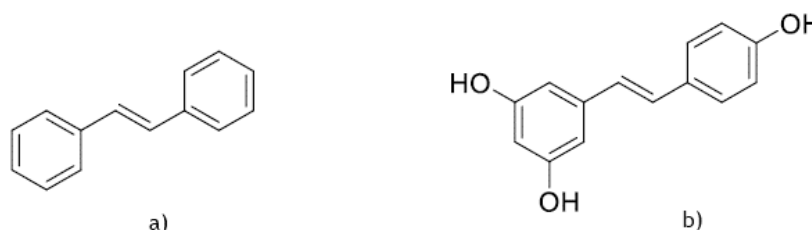


Fig. 1.1. Scheletul de stilbenă (a) și structura chimică a resveratrolului (b)

În tabelul 1.1 sunt prezentate elementele de identificare, proprietățile fizice și datele tehnice de securitate a resveratrolului.

Tabel 1.1. Elemente de identificare, proprietăți fizice și date tehnice de securitate a resveratrolului

Resveratrol	
Elemente de identificare	
Alte denumiri	<i>trans</i> -3,5,4'-Trihydroxystilbene 3, 4',5-Stilbenetriol <i>trans</i> -Resveratrol (<i>E</i>)-5(<i>p</i> -Hydroxystyryl)resorcinol (<i>E</i>)-5-(4-hydroxystyryl)benzene-1,3-diol
Număr CAS	501-36-0
Proprietăți fizico-chimice	
Formulă chimică	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
Masă molară	228,25 g/mol
Aspect	Pulbere albă cu nuanțe ușor gălbui
Punct de fierbere	528 °C
Punct de topire	261-263 °C (502-505 °F, 534-536 °K)
Solubilitate în apă	0,03 g/l
Solubilitate în dimetilsulfoxid	16 g/l
Solubilitate în etanol	50 g/l
UV-Vis (λ_{max})	304 nm (<i>trans</i> -resveratrol, în soluție aposă) 286 nm (<i>cis</i> -resveratrol, în soluție apoasă)
Date tehnice de securitate	
Fraze de risc	R36 – Iritant pentru ochi
Fraze de siguranță	S26 – În cazul contactului cu ochii, spălați imediat cu multă apă și consultați medicul.
Doză letală LD50	5,29 g

S-a constatat că unele plante sintetizează resveratrolul ca răspuns la diferiți factori de stres (lezare, expunere la doze ridicate de radiații ultraviolete, parazitare fungică etc). Acesta se găsește în ambele forme stereoizomerice (*cis* în cantități foarte mici și *trans* cel mai prezent) și este liposolubil [Bi,'18].

În ceea ce privește alimentele, substanța se găsește în struguri (doar în coajă și în cantități diferite în funcție de soi, regiune și expunerea la infecții fungice) [Ec,'96], alune, fructe de pădure din familia *Vaccinum* (coacăze roșii și negre, afine și merișoare).

Resveratrolul este, de asemenea prezent în vinuri, în special în vinurile roșii și în cantitate mult mai mică în vinurile albe [Al,'14a]. Acest lucru se datorează faptului că în procesul de obținere al vinului alb pielea strugurilor este îndepărtată mai devreme [Fa,'18b]. Resveratrolul se găsește în cantități diferite în struguri și vița de vie, cea mai mare cantitate fiind în tulpină, urmată de pielea strugurilor, semințe și pulpă [He,'12b].

Primul articol care face referire la resveratrol a apărut încă din anul 1939. Prezența resveratrolului în vinul roșu a fost descoperită pentru prima dată de cercetătorii Universității Cornell, Siemann și Creasy, în 1992 [Si,'92]. Această descoperire a legat compusul de faimosul „paradox francez”, un termen derivat din cercetarea epidemiologică care a arătat că rata mortalității datorată bolilor cardiovasculare era semnificativ mai mică la populația franceză în comparație cu alte țări europene, în ciuda consumului lor mai mare de colesterol și grăsimi animale saturate [Ri,'81]. Investigațiile ulterioare au sugerat că riscurile mai mici ale bolilor

cardiovasculare ar putea fi atribuite obiceiului de a consuma mai des vin roșu în rândul francezilor [Ol,'01].

Produsul este deja disponibil pe piață sub diferite forme. Piața acestui supliment este în continuă creștere deoarece cererea este mai mare decât oferta, acest produs având utilizări în industria farmaceutică, cosmetică și alimentară [Am,'12]. Datorită cererii în continuă creștere a suplimentelor de resveratrol, interesul cercetătorilor privind extracția și purificarea resveratrolului din deșeurile rezultate din industria vinului a crescut, astfel această nouă oportunitate de valorificare a deșeurilor a fost intens studiată în ultimii ani.

1.2. Efectele benefice ale resveratrolului asupra sănătății

Activitatea biologică ridicată a produselor naturale din plante și-a câștigat locul în practicile medicinale tradiționale ale multor culturi, triburi și civilizații de-a lungul secolelor. Printre compușii care se întâlnesc în mod natural în plante, s-a demonstrat că resveratrolul în particular conferă efecte benefice sănătății umane și bunăstării prin modularea unei varietăți de căi metabolice și enzimatiche diferite în organism [Ga,'15]. Efectele benefice ale resveratrolului precum și căile metabolice prin care acționează sunt exemplificate în graficul din figura 1.4.

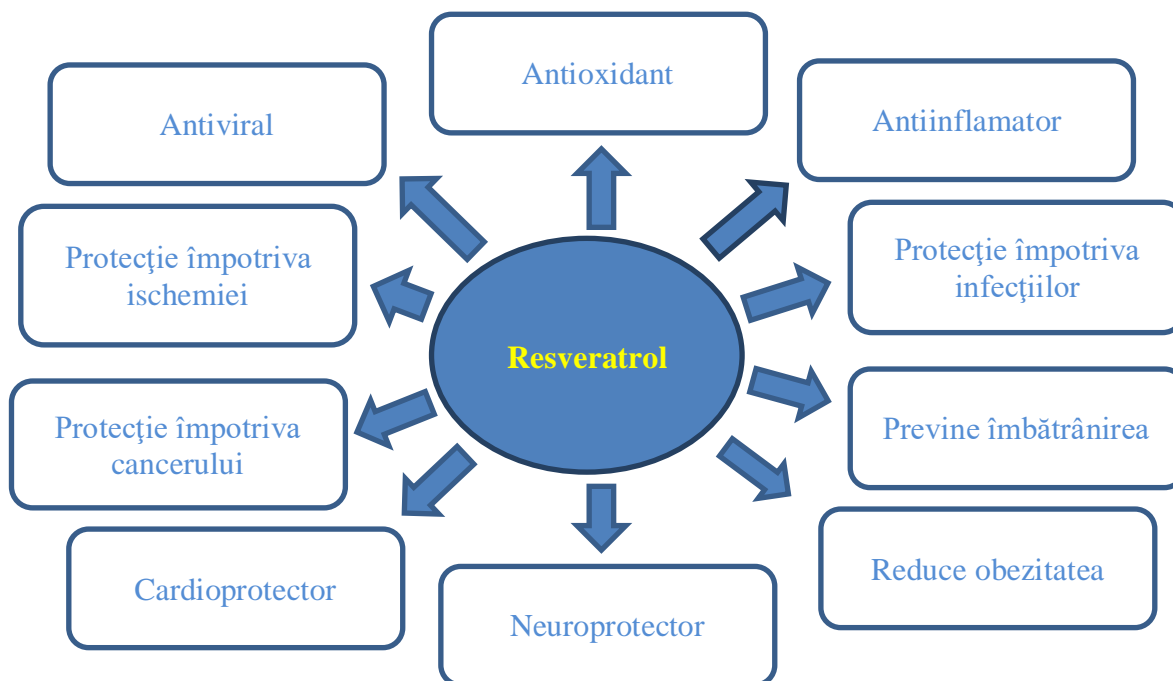


Fig. 1.2. Efectele benefice ale resveratrolului

1.3. Valorificarea deșeurilor de viță de vie pentru extracția resveratrolului

Datorită faptului că resveratrolul este o fitoalexină naturală, acesta este sintetizat de o multitudine de plante, aproximativ 700 specii [Bo,'01]. Deoarece cantitatea de resveratrol sintetizat de către plante variază în limite largi, doar câteva plante prezintă interes în vederea extragerii și purificării acestuia pentru obținerea de suplimente alimentare [Mo,'17]. Cele mai cunoscute plante cu un conținut semnificativ de resveratrol sunt vița de vie (*Vitis vinifera*) și trestia japoneză (*Polygonum cuspidatum*) [Pa,'13].

Studiile recente în domeniu au identificat și alte plante care conțin resveratrol, cum ar fi câteva specii de molid: *Picea mariana*, *Picea abies*, *Picea glauca*, *Picea sitchensis*, alunele

(*Arachis hypogaea*) [Ch,'03], leguminoasele (*Cassia spp.*), eucaliptul (*Eucalyptus globulus*) și altele (tabel 1.2).

Tabel 1.2. Diferite specii de plante care conțin resveratrol [Ag,'05]



Arahide
Arachis hypogaea



Jackfruit
Artocarpus spp.



Leguminoase
Cassia spp.



Arbore de orhidee fluture
Bauhinea spp.



Eucalipt
Eucalyptus globulus



Gnetum
Gnetum montanum



Dude
Morus rubra



Molid
Picea spp.



Pin
Pinus sylvestris



Trestie japoneză
Polygonum cuspidatum



Revent
Rheum raphanistrum



Afine
Vaccinum spp.



Merișoare
Vaccinum spp.



Steregoaie
Veratrum spp.



Crin de munte
Veratrum spp.



Viță de vie
Vitis vinifera

1.4. Conținutul de resveratrol din deșeurile de viță de vie

Multe dintre preparatele comerciale ale resveratrolului sunt extrase din rădăcina de trestie japoneză (*Polygonum cuspidatum*) și variază în limite largi ca grad de puritate.

Polygonum cuspidatum (*Polygonaceae*) este o plantă perenă răspândită pe scară largă în China, Japonia și Coreea și, de asemenea, în toată America de Nord. Rădăcinile uscate ale acestei plante au fost folosite în mod tradițional în China și Japonia ca remedii populare pe bază de plante pentru tratamentul aterosclerozei, tusei, astmului, hipertensiunii arteriale și chiar a cancerului [Va,'00].

Concentrația de resveratrol din trestia japoneză variază în limite largi și poate ajunge până la 3,82 mg/g s.u. atunci când se extrage forma sa liberă [Ku,'13]. Concentrații mai mari de resveratrol pot fi obținute din rădăcinile acestei plante prin extracția și hidroliza formei glicozidice a resveratrolului, și anume a polidatinei, care este prezentă în plantă. În acest scop au fost dezvoltate mai multe tehnici de hidroliză și extracție a resveratrolului. Mantegna et al. (2012) au realizat extracția apoasă asistată cu ultrasunete și încapsularea cu ciclodextrine ajungând la 7,51 mg resveratrol total (glucozid polidatin liber + scindat) pe gram de plantă uscată [Ma,'12a].

Extracția resveratrolului din *Polygonum cuspidatum* este complicată și costisitoare datorită necesarului mare de solvenți organici pentru extracția și hidroliza glicozidei sale corespunzătoare, și anume polidatina. Sun et al. (2021) au realizat o metodă bazată pe extracția cu solvent eutectic profund pentru extracția și conversia simultană a polidatinei în resveratrol, ajungând la o concentrație de $12,26 \pm 0,14$ mg/g s.u. [Su,'21]. Wang et al. (2021) au efectuat extracția și conversia simultană a resveratrolului prin aceeași metodă, cu solvent eutectic profund acid natural, obținând un extract cu concentrația de 12,31 mg/g s.u. [Wa,'21].

Unele studii demonstrează că un compus suplimentar cum ar fi emodina este prezent în extractele de resveratrol nepurificate sau purificate parțial, și ar putea avea efect laxativ [Sr,'07].

Deoarece planta prosperă chiar și în medii puternic poluate cu soluri contaminate cu metale grele, absorbția celulară a acestor contaminanți de către țesuturile rădăcinii ridică probleme suplimentare cu privire la siguranța preparatelor comerciale de resveratrol obținute din rădăcinile acestei plante [Be,'14] [No,'63].

O altă sursă reprezentativă pentru extracția acestui compus valoros este reprezentată de deșeurile rezultate din industria vinului, care conține resveratrol în cantități ridicate. Studiile recente au demonstrat prezența acestui compus în cantitate ridicată în diferite subproduse rezultate din industria vinului, cum ar fi: deșeurile lemnoase rezultate de la toaletarea viței de vie, tescovina de struguri și ciorchinii rezultați în urma tehnologiei de fabricare a vinului [Aa,'03].

Viticultura este una dintre cele mai importante activități agricole din lume, cu aproximativ 7,4 milioane hectare cultivate în lume în 2018 dintre care 4,3 milioane hectare sunt cultivate în Europa. Prima țară este reprezentată de Spania, cu o suprafață de 969000 hectare, urmată de China cu 875000 hectare și Franța cu 793000 hectare. România se află pe locul 10 în lume ca suprafață cultivată cu viță de vie, aproximativ 180000 hectare. Un sfert din județele în care se cultivă viță de vie concetreză peste 65% din suprafața totală, Vrancea fiind județul cu cea mai mare suprafață cultivată [*].

Media anuală de subproduse rezultate de la curățarea viței de vie este de 1,3 kg material lemnos/butuc vie, de unde rezultă 2×10^7 tone material lemnos recoltat anual în lume. În prezent singura utilizare a acestor deșeuri este folosirea lor ca îngrășământ pentru vița de vie, prin măcinare și distribuire pe plantațiile de viță de vie [Ce,'17].

Compoziția chimică a lăstarilor de viță de vie se caracterizează printr-o fracție de holoceluloză de aproximativ 55,1% (31,9% α -celuloză și 23,2% hemiceluloză) și o altă fracție de lignină, de aproximativ 38,5%. Cea mai importantă fracție este fracția minoră, reprezentată

de compușii fenolici și volatili, dintre care stilbenele reprezintă compușii cei mai căutați în industria alimentară, farmaceutică și cosmetică [Ce,'17].

Datorită cererii tot mai mari de resveratrol pentru obținerea de suplimente alimentare, cercetătorii din multe țări și-au îndreptat atenția asupra deșeurilor rezultate în urma tehnologiei de fabricare a vinului [Sa,'13].

Capitolul II, Cercetări experimentale privind analiza conținutului de resveratrol din vinurile comerciale românești, prezintă rezultatele studiilor efectuate asupra conținutului de resveratrol din vinurile românești.

Resveratrolul (*trans*-3,5,4'-trihidroxistilbenă) este o fitoalexină produsă în mod natural de 72 de specii diferite de plante, în special de vița de vie, trestia japoneză și pinul, ca răspuns la unii factori exogeni, cum ar fi radiațiile UV, stresul chimic și paraziții fungici. Odată cu descoperirea „paradoxului francez”, resveratrolul a intrat în atenția cercetătorilor. „Paradoxul francez” este un termen generat în 1992 care se referă la efectele cardioprotectoare ale resveratrolului descoperite pe baza datelor de la francezi care au arătat o corelație inversă între consumul de vin și incidența bolilor coronariene în ciuda unei diete bogate în grăsimi saturate. Scopul prezentului studiu este de a determina conținutul de *trans*-resveratrol din 11 probe de vin comerciale românești prin injectare directă în cromatograful HPLC cuplat cu detector cu șir de fotodiode DAD, după ce a fost filtrat prin filtre cu membrană PTFE de 0,45 μm.

Concentrația de *trans*-resveratrol din vinuri a variat între 0,04 și 6,64 mg/l. Toate rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.1. Concentrația de resveratrol este mult mai mare la vinurile roșii decât la cele albe, iar conținutul de resveratrol din vinurile rosé este cuprins între cele două valori. De asemenea, se poate observa că nivelul de resveratrol din vinurile produse din același soi de struguri poate varia foarte mult (pentru Pinot Noir 3,14 și 6,64 mg/l) [Cr,'21b]. Datorită faptului că nivelul de resveratrol este influențat de diverși factori (climă, temperatură, condiții de creștere, iradiere UV, expunerea la infecții fungice și bacteriene și tehnologia de producție), aceste rezultate sunt justificate [Mc,'94]. După cum se poate observa în tabelul 2.2, cel mai mare conținut de *trans*-resveratrol se găsește în vinul din soiul Pinot Noir – Roșu 4, iar cel mai mic conținut este în vinul din soiul Sauvignon Blanc – Alb 3. Conținutul mediu de *trans*-resveratrol în vinurile roșii este de 4,31 mg/l, iar în vinurile albe este de 0,07 mg/l. Aceste rezultate sunt similare cu cele raportate anterior pentru vinurile românești (tabel 2.1) [Je,'95].

Tabel 2.1. Conținutul de *trans*-resveratrol în vinurile comerciale românești

Probe de vin	Conținut de <i>trans</i> -resveratrol (mg/l)
Roșu 1 – Pinot Noir	3,14 (0,20)
Roșu 2 – Merlot	6,17 (0,41)
Roșu 3 – Cabernet Sauvignon	2,39 (0,16)
Roșu 4 – Pinot Noir	6,64 (0,26)
Roșu 5 – Fetească Neagră	3,91 (0,14)
Roșu 6 – Merlot	5,42 (0,38)
Roșu 7 – Cabernet Sauvignon	2,50 (0,10)
Alb 1 – Sauvignon Blanc	0,04 (0,01)
Alb 2 – Grasă de Cotnari	0,14 (0,02)
Alb 3 – Sauvignon Blanc	0,03 (0,01)
Rosé – Merlot Rosé	0,32 (0,02)

Concentrația de resveratrol din vin este influențată de o multitudine de factori (climat, temperatură, condiții de creștere, iradiere UV, expunere la infecții fungice și bacteriene și tehnologia de producție) [Go,'95], iar concentrația acestuia poate fi diferită chiar dacă analiza

se efectuează pe un sortiment de vin produs din același soi de struguri și în aceleași condiții, dar materia primă este recoltată în ani diferiți [So,'01].

Capitolul III, Cercetări experimentale privind analiza conținutului de resveratrol din deșeuri de viță de vie de diferite soiuri reprezintă evaluarea potențialului ca sursă naturală de *trans*-resveratrol a lăstarilor de viță de vie din zece soiuri de struguri (Fetească Albă, Fetească Neagră, Muscat Ottonel, Muscat de Hamburg, Tămâioasă, Coarnă Neagră, Merlot, Cabernet Sauvignon, Fetească Regală și Burgund Mare) din două locații diferite. Pentru a atinge acest obiectiv, au fost testați doi solvenți de extracție diferiți, două perioade de depozitare diferite, trei timpi diferiți de recoltare a probelor în doi ani diferiți. A fost analizată și o posibilă corelație între tipul de viță de vie (roșu sau alb) și conținutul de *trans*-resveratrol.

3.1. Probe de lăstari de viță de vie

Un număr de 15 probe de lăstari de viță de vie au fost colectate din două regiuni diferite. Dintre acestea, 4 probe au fost recoltate din regiunea Ștefănești, județul Argeș, la 30 mai 2019: *Vitis vinifera* (Merlot, Fetească Regală, Cabernet Sauvignon și Burgund Mare) și 11 probe au fost recoltate din regiunea Cotnari, județul Iași. Din cele 11 probe, 3 probe au fost recoltate la 07 octombrie 2019: *Vitis vinifera* (Fetească Albă, Muscat de Hamburg și Muscat Ottonel), 4 probe au fost colectate la 22 mai 2020: Tămâioasă, Fetească Albă, Coarnă Neagră și Muscat Ottonel și 4 probe au fost colectate pe 07 noiembrie 2020: Muscat Ottonel, Fetească Albă, Fetească Neagră și Coarnă Neagră.

3.2. Randamentul extracției cu solvent

După cum se poate observa în tabelul 3.1, solventul dietil-eter:etanol în raport de 1:4 a avut un randament de extracție mai mare în toate cazurile. Creșterea cantității de resveratrol extrase a variat de la 5% (pentru Fetească Albă de la 0,20 mg/kg s.u. cu metanol 80% până la 0,21 mg/kg s.u.) până la 1569% (pentru Tămâioasă de la 0,36 mg/kg s.u. până la 6,01 mg/kg s.u.).

Tabel 3.1. Conținutul de resveratrol al probelor recoltate din aceeași zonă (regiunea Cotnari, județul Iași) extrase cu metanol 80% și dietil-eter:etanol în raport de 1:4

Soi	Solvent de extracție		Timp de depozitare a probelor
	Metanol 80% (resveratrol, mg/kg s.u.)	Dietil-eter:etanol în raport de 1:4 (resveratrol, mg/kg s.u.)	
Fetească Albă	107,09	178,65	12 săptămâni
Muscat Ottonel	58,96	106,66	
Muscat de Hamburg	51,27	106,99	
Tămâioasă	0,36	6,01	6 săptămâni
Coarnă Neagră	1,42	1,57	
Muscat Ottonel	1,51	12,52	
Fetească Albă	0,37	1,89	12 săptămâni
Tămâioasă	0,35	1,15	
Coarnă Neagră	0,21	0,28	
Muscat Ottonel	0,24	0,66	
Fetească Albă	0,20	0,21	

Fetească Neagră	374,03	1676,39	6 săptămâni
Fetească Albă	113,18	604,73	
Muscat Ottonel	525,04	735,76	
Coarnă Neagră	89,14	468,91	
Fetească Neagră	820,26	2367,37	12 săptămâni
Fetească Albă	92,98	524,37	
Muscat Ottonel	315,19	525,04	
Coarnă Neagră	157,19	261,21	

3.3.2. Influența timpului de păstrare asupra conținutului de resveratrol

Publicațiile recente au dat naștere la ipoteza că *trans*-resveratrolul se acumulează în deșeurile de viță de vie în timpul depozitării post-recoltare [Go,'14] [Ho,'15b]. Houillé et al. (2015) au raportat o creștere puternică, de aproximativ 40 de ori, a concentrației monomerului *trans*-resveratrol în primele 6 săptămâni de depozitare la 20 °C a lăstarilor de viță de vie tăiați. Acest fenomen observat la 8 soiuri diferite s-a datorat inducerii metabolismului stilbenoid [Ho,'15b]. Tabelul 3.2 prezintă concentrațiile de resveratrol în lăstari de viță de vie după 6 și 12 săptămâni de depozitare.

Tabelul 3.2. Conținutul de resveratrol al probelor de lăstarii de viță de vie după 6 și 12 săptămâni de depozitare la 20 °C extras cu metanol 80%

Soi	Timp de depozitare		Set de probe
	6 săptămâni (resveratrol, mg/kg s.u.)	12 săptămâni (resveratrol, mg/kg s.u.)	
Merlot	17,82	29,28	I
Cabernet Sauvignon	20,58	23,39	
Fetească Regală	17,74	3,13	
Burgund Mare	6,75	4,43	
Tămâioasă	0,36	0,35	
Muscat Ottonel	12,52	0,24	III
Coarnă Neagră	1,42	0,21	
Fetească Albă	0,37	0,20	
Fetească Neagră	374,03	820,26	IV
Fetească Albă	113,03	92,98	
Muscat Ottonel	149,98	315,48	
Coarnă Neagră	89,14	157,19	

Creșterea concentrației de resveratrol se înregistrează pentru 5 probe, variind între 64% (pentru Merlot de la 17,82 mg/kg s.u. până la 29,28 mg/kg s.u.) și 119% (pentru Fetească Neagră de la 374,03 mg/kg s.u. până la 820,26 mg/kg s.u.), iar scăderea concentrației de resveratrol se înregistrează pentru 7 probe, variind între 2,78% (pentru Tămâioasă de la 0,36 mg/kg s.u. până la 0,35 mg/kg s.u.) și 98% (pentru Muscat Ottonel de la 12,52 mg/kg s.u. până la 0,24 mg/kg s.u.). Ewald et al. (2017) au raportat o creștere semnificativă (400 până la 1400%) a *trans*-resveratrolului pe parcursul celor 6 luni de depozitare. După încă 6 luni de depozitare, conținutul de *trans*-resveratrolul a scăzut în toate probele de lăstari, cu excepția soiului Regent [Ew,'17]. Faptul că depozitarea post-tăiere a lăstarilor de viță de vie are un impact direct asupra concentrației de *trans*-resveratrol este confirmat de studiul realizat de Cebrián et al. (2017), care au raportat o creștere semnificativă a acestui monomer în primele 3 luni de depozitare pentru

soiul Airén (de la 77,10 până la 151,60 mg/kg s.u.) și Cencibel (de la 50,41 până la 224,83 mg/kg s.u.) [Ce,'17].

3.3.3. Influența perioadei de colectare

Concentrația de resveratrol din cele 3 seturi de probe de lăstari de viță de vie a variat considerabil, așa cum se poate observa în tabelul 3.3, cele mai mari concentrații fiind înregistrate pentru setul de probe colectate în noiembrie 2020. Cele mai scăzute concentrații au fost determinate pentru setul de probe colectate în mai 2020. Influența timpului de recoltare este evident pentru soiul Fetească Albă și Muscat Ottonel. Sezonul de recoltare cel mai nefavorabil ar fi primăvara, obținându-se cele mai mici valori ale conținutului de resveratrol. Sezonul cel mai favorabil este toamna, mai ales luna noiembrie [Cr,'22b].

Tabel 3.3. Conținutul de resveratrol pentru probele de lăstari de viță de vie prelevate din aceeași zonă (regiunea Cotnari, județul Iași) extrase cu dietil-eter:etanol în raport de 1:4 după 12 săptămâni de depozitare

07 Octombrie 2019 (II)		22 Mai 2020 (III)		07 Noiembrie 2020 (IV)	
Soi	Resveratrol (mg/kg s.u.)	Soi	Resveratrol (mg/kg s.u.)	Soi	Resveratrol (mg/kg s.u.)
Fetească Albă	178,65	Fetească Albă	0,51	Fetească Albă	524,37
Muscat Ottonel	109,66	Muscat Ottonel	0,66	Muscat Ottonel	525,04
Muscat de Hamburg	106,66	Coarnă Neagră	0,28	Coarnă Neagră	261,21
		Tămâioasă	1,15	Fetească Neagră	2367,37

3.3.4. Influența varietății

Vinurile roșii, în general, conțin o cantitate mare de *trans*-resveratrol, în timp ce în vinurile albe *trans*-resveratrolul apare în cantități reduse [Ra,'04] [Cv,'10] [Pa,'18]. Analiza a fost efectuată pentru a determina dacă această constatare se aplică și probelor de lăstari de viță de vie din diferite soiuri de struguri.

Probele de lăstari au fost împărțite în 2 categorii, în funcție de soiul de struguri, albi sau roșii pentru a vedea dacă conținutul de resveratrol poate fi corelat cu soiul de struguri. Cantitatea de resveratrol a variat foarte mult, astfel încât nu a putut fi stabilită o corelație. Concentrația medie de *trans*-resveratrol este de 82,3 mg/kg s.u. pentru soiurile albe și 221,73 mg/kg s.u. pentru soiurile roșii. Anastasiadi et al. (2012) au constatat că concentrația medie de *trans*-resveratrol este de 149 mg/kg s.u. pentru soiurile roșii și 113 mg/kg s.u. pentru soiurile albe în lăstarii de viță de vie [An,'12]. Piñeiro et al. (2016) au raportat un conținut de *trans*-resveratrol pentru extractele de lăstari de viță de vie care a variat între 37,4-1529 mg/kg s.u. pentru soiurile albe și 45,6-664,9 mg/kg s.u. pentru soiurile roșii [Pi,'16]. Cel mai mare conținut de resveratrol pentru soiurile roșii din acest studiu a fost înregistrat pentru soiul Fetească Neagră (820,26 mg/kg s.u.), iar pentru soiurile albe la soiul Muscat Ottonel (315,48 mg/kg s.u.) (tabel 3.4).

Tabel 3.4. Conținutul de resveratrol pentru probele de lăstari de viță de vie recoltate din aceeași zonă (regiunea Cotnari, județul Iași) extrase cu metanol 80% după 12 săptămâni de depozitare

Viță de vie cu struguri albi		Viță de vie cu struguri roșii		Set de probe
Soi	Resveratrol (mg/kg s.u.)	Soi	Resveratrol (mg/kg s.u.)	
Fetească Albă	107,9	Muscat de Hamburg	51,27	II
Muscat Ottonel	58,96	-	-	
Tămăioasă	0,35	Coarnă Neagră	0,21	III
Muscat Ottonel	0,24	-	-	
Fetească Albă	0,20	-	-	IV
Muscat Ottonel	315,48	Fetească Neagră	820,26	

Capitolul IV, Cercetări experimentale privind studiul variației conținutului de *trans*-resveratrol și determinarea conținutului de polifenoli totali și a activității antioxidante din deșeuri de viță de vie cuprinde rezultatele studiilor privind creșterea resveratrolului în lăstarii de viță de vie (*Vitis vinifera*) soiul Fetească neagră pe o perioadă de 90 de zile pentru a determina perioada optimă de depozitare cu scopul atingerii unui conținut maxim de *trans*-resveratrol. Conținutul total de polifenoli și activitatea antioxidantă au fost studiate pentru a determina posibile corelații.

4.1. Analiza variației conținutului de resveratrol, a conținutului total de polifenoli și a activității antioxidante în frunze, cârcei și lăstari de viță de vie

Curățarea viței de vie generează cantități considerabile de deșeuri vegetale în fiecare an (cârcei, frunze și lăstari) [Li,'13b]. Acest deșeu vegetal ar putea fi o sursă importantă de substanțe fitochimice de mare valoare deoarece nu are nici o utilizare și ar putea contribui la programele de sustenabilitate [Ra,'08]. *Trans*-resveratrolul se găsește din abundență în aceste deșeuri de viță de vie, iar conținutul său poate varia foarte mult în funcție de tipul de deșeu [So,'93]. Rezultatele pentru probele analizate după 42 de zile sunt reprezentate în tabelul 4.1.

Tabel 4.1. Analiza variației conținutului de resveratrol, conținutul total de polifenoli și activitatea antioxidantă în frunze, cârcei și lăstari din viță de vie. Valori medii și abatere standard între paranteze

Parametru	Tip de deșeu			Valoare <i>F</i>
	Frunze	Lăstari	Cârcei	
Resveratrol (mg/kg s.u.)	43,54 (0,08) ^c	1658,22 (0,17) ^a	169,92 (0,03) ^b	131472834,15***
Conținutul total de polifenoli (mg GAE/g s.u.)	30,42 (0,32) ^a	29,36 (0,41) ^{ab}	28,65 (0,81) ^b	50,43***
DPPH (%)	73,19 (0,04) ^a	52,72 (0,22) ^b	14,19 (0,05) ^c	95811,06***

După cum se poate observa, cea mai mare concentrație de resveratrol se află în lăstarii de viță de vie (1658,22 mg/kg s.u.), urmați de cârcei (169,92 mg/kg s.u.) și frunze (43,54 mg/kg s.u.). Lăstarii de viță de vie conțin de până la 10 ori mai mult *trans*-resveratrol decât cârceii și de până la 40 de ori mai mult decât frunzele. Deși, pe lângă lăstarii de viță de vie, aceste deșeuri

de viță conțin și *trans*-resveratrol, extracția și purificarea nu sunt recomandate din punct de vedere economic.

4.2. Creșterea concentrației resveratrolului în timpul depozitării post-tăiere

Acumularea de *trans*-resveratrol în timpul perioadei de depozitare este raportată în multe studii [Go,'14] [Ce,'17] [Ew,'17]. Cercetările recente au demonstrat că datorită genelor căii de biosinteză (PAL, C4H, 4CL și STS), prezente din abundență, în special gena STS (formând *trans*-resveratrol), care a fost indusă în primele 4 săptămâni de depozitare, conținutul de *trans*-resveratrol a crescut.

Timpul de păstrare a lăstarilor de viță de vie după tăiere a dus la o acumulare importantă de *trans*-resveratrol, cu o inducție maximă de 181 de ori în ziua 70 și o medie maximă pentru zilele 71-75, după cum se poate observa în tabelul 4.2. Pentru a evidenția creșterea conținutului de *trans*-resveratrol pe parcursul celor 90 de zile, rezultatele medii au fost calculate pentru 5 zile consecutive și sunt prezentate în figura 4.3.

Ziua 1 a analizei a fost momentul în care deșeurile de viță de vie au fost colectate din podgorie. Prima probă a fost uscată și apoi extrasă cu un solvent compus din etanol-dietil eter în raport de 1:4. Valoarea minimă a conținutului de *trans*-resveratrol în lăstarii de viță de vie a fost înregistrată în prima zi a analizei (14,93 mg/kg s.u.), iar valoarea maximă a fost înregistrată în ziua 70 a analizei (2712,86 mg/kg s.u.) [Cr,'22a].

Tabel 4.2. Analiza variației conținutului de resveratrol, conținutului total de polifenoli și a activității antioxidante în lăstarii de viță de vie timp de 90 de zile. Valori medii și abatere standard între paranteze

Parametru	Timp de depozitare (zile)															Valoare F			
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75		80	85	90
Resveratrol (mg/kg s.u.)	86,58 (1,24) ^e	163,56 (2,31) ^{de}	282,53 (3,01) ^d	386,44 (5,12) ^d	557,92 (7,89) ^{cd}	923,10 (13,05) ^c	1190,79 (16,84) ^c	1236,28 (17,48) ^{bc}	1349,59 (19,09) ^b	1401,91 (19,24) ^{ab}	1510,93 (18,62) ^a	1524,73 (19,40) ^a	1563,39 (22,24) ^a	1605,61 (22,70) ^a	1753,50 (24,80) ^a	1532,31 (21,67) ^a	1335,31 (18,89) ^b	1135,43 (16,05) ^b	2044,65 ^{***}
Conținutul total de polifenoli (mg GAE/g s.u.)	35,86 (0,53) ^a	24,75 (0,34) ^b	26,45 (0,37) ^b	35,43 (0,58) ^a	28,16 (0,45) ^a	28,48 (0,41) ^a	23,53 (0,34) ^{bc}	20,64 (0,35) ^c	25,86 (0,43) ^b	27,09 (0,41) ^{ab}	35,38 (0,56) ^a	20,30 (0,32) ^c	20,45 (0,35) ^c	29,37 (0,42) ^a	21,97 (0,36) ^c	23,24 (0,37) ^{bc}	23,70 (0,31) ^{bc}	29,18 (0,43) ^a	3380,74 ^{***}
DPPH (%)	31,90 (0,45) ^f	39,84 (0,56) ^{de}	44,09 (0,62) ^d	35,16 (0,50) ^e	41,77 (0,59) ^d	35,81 (0,51) ^e	44,19 (0,62) ^d	58,06 (0,82) ^{ab}	48,09 (0,68) ^c	58,22 (0,82) ^{ab}	59,53 (0,84) ^a	56,34 (0,80) ^b	60,72 (0,86) ^{ab}	50,85 (0,72) ^c	51,38 (0,73) ^c	48,44 (0,69) ^{cd}	76,52 (1,08) ^a	35,97 (0,51) ^e	518,39 ^{***}

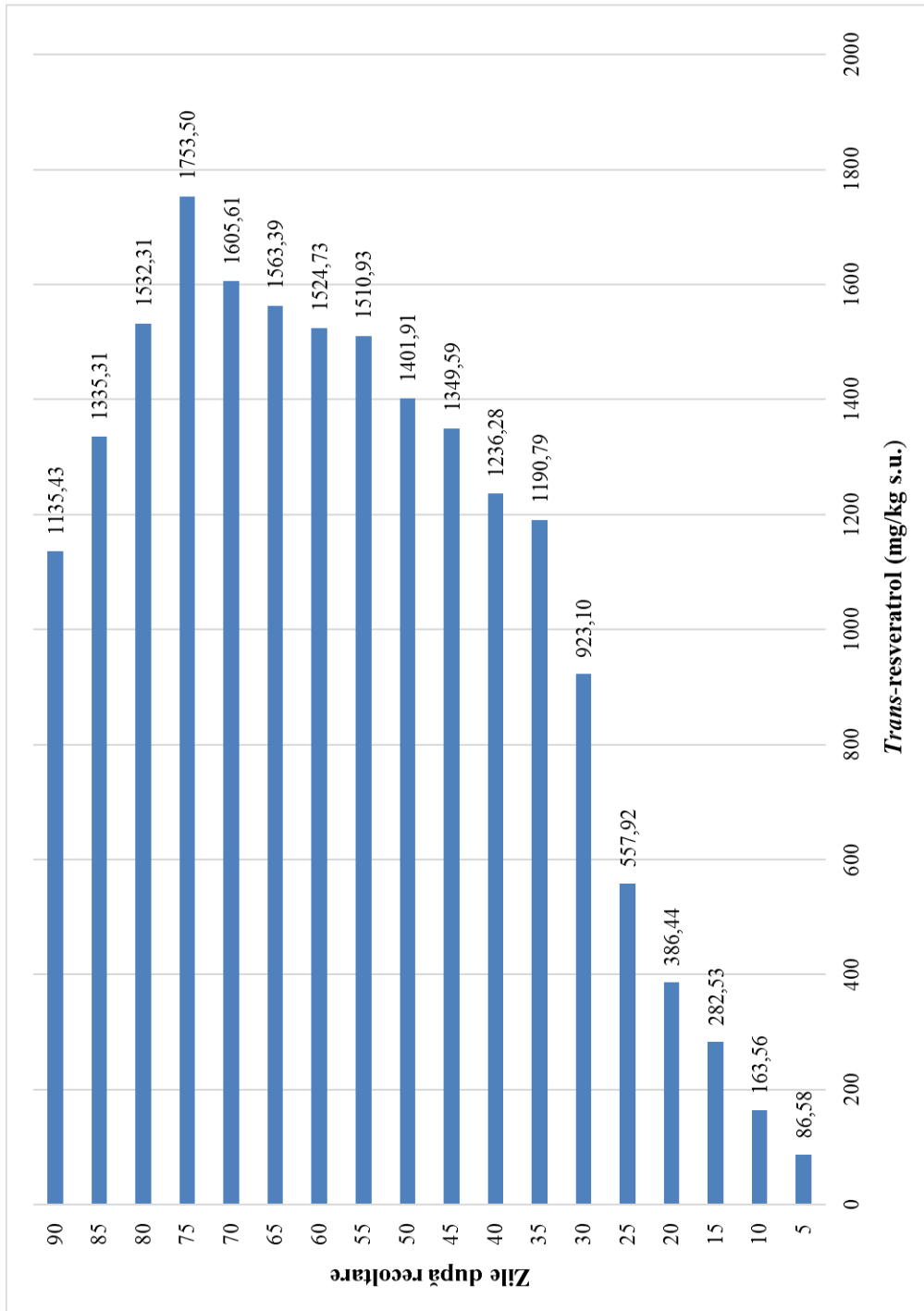


Fig. 4.3. Creșterea *trans-resveratrolului* în lăstarii de viță de vie timp de 90 de zile

4.3. Conținutul total de polifenoli

Conținutul total de polifenoli al lăstarilor de viță de vie a fost estimat prin metoda colorimetrică Folin-Ciocalteu. După cum se observă în figura 4.4, valorile conținutului total de polifenoli au rămas constante, între 20 și 30 mg echivalenți acid galic (GAE)/g s.u., cu excepția a 5 zile când s-au înregistrat valori mai mari. Cea mai mare valoare a fost înregistrată în ziua 54 (82,42 mg GAE/g s.u.), iar cea mai scăzută în ziua 57 (14,61 mg GAE/g s.u.). Conținutul total de polifenoli a rămas constant, fapt care s-ar putea datora prezenței polifenolilor, alții decât *trans*-resveratrolul, al căror conținut poate crește, scădea sau rămâne constant pe parcursul celor 90 de zile (piceatanol [Ho,'15b] [Bi,'18], apigenină, acid elagic [Je,'19], viniferină [Do,'06], *trans*-vitizină, *trans*-piceid [We,'14], acid galic, acid elagic, acid *p*-cumaric etc. [Mo,'18]).

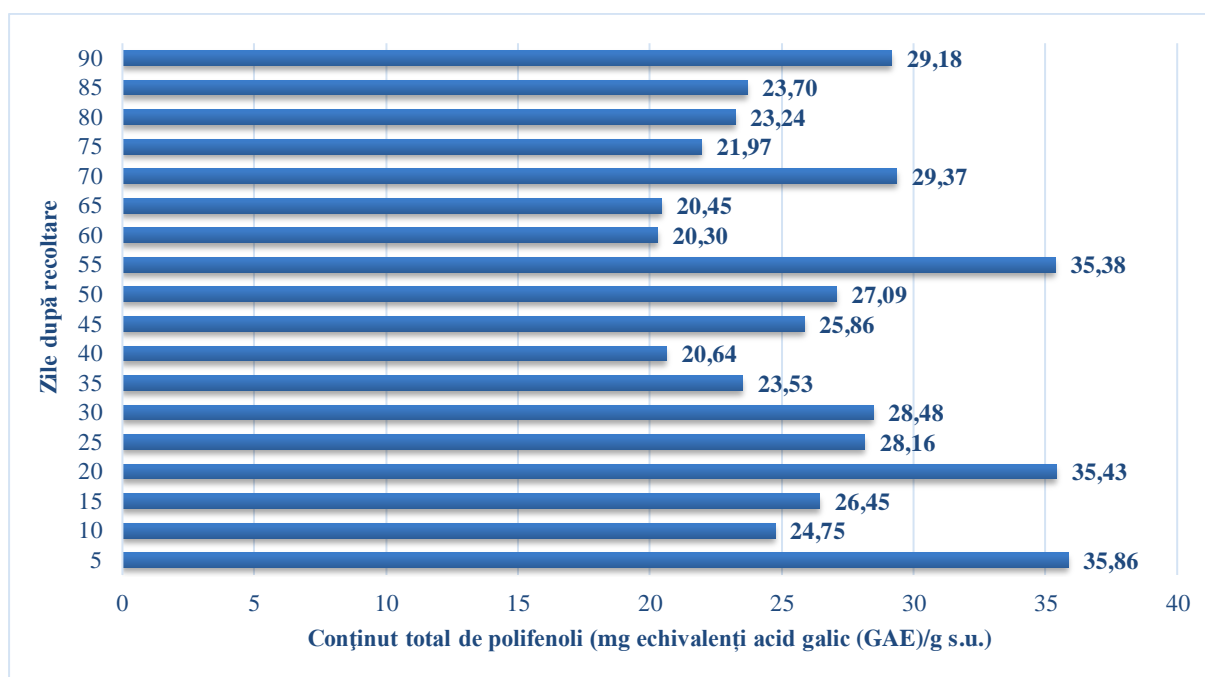


Fig. 4.4. Conținutul total de polifenoli din lăstari în timpul celor 90 de zile post-recoltare

4.4. Activitatea antioxidantă prin metoda DPPH

Activitatea antioxidantă a extractelor a fost măsurată folosind testul de captare a radicalilor DPPH, așa cum este descris de Liu et al. (2015) [Li,'15]. Au fost efectuate mai multe studii de cercetare pentru a determina activitatea antioxidantă a lăstarilor de viță de vie, prin diferite metode însă cea mai utilizată a fost metoda DPPH [Mo,'18] [Ru,'15] [Ba,'14] [Ju,'16] [Ka,'10] [Ra,'15b] [Gu,'16]. Deși au fost raportate multe date, activitatea antioxidantă a fost exprimată în μM echivalent Trolox/mg extract sau procent de inhibiție (IC_{50}) și o comparație a rezultatelor nu este posibilă. În plus, chiar dacă lăstarii de viță de vie sunt din același soi, metodele analitice folosite pentru extracție pot varia foarte mult, așa cum indică majoritatea studiilor [Fa,'16] [Ru,'15] [Ka,'10] [Ra,'15b] [Gu,'16]. Timpii de păstrare a lăstarilor după recoltare au evidențiat o ușoară creștere a activității antioxidante începând cu ziua 1 (31,9% inhibiție DPPH), atingând un maxim de 76,52% inhibare DPPH în ziua 85, urmată de o scădere bruscă, după cum se poate observa în figura 4.5.

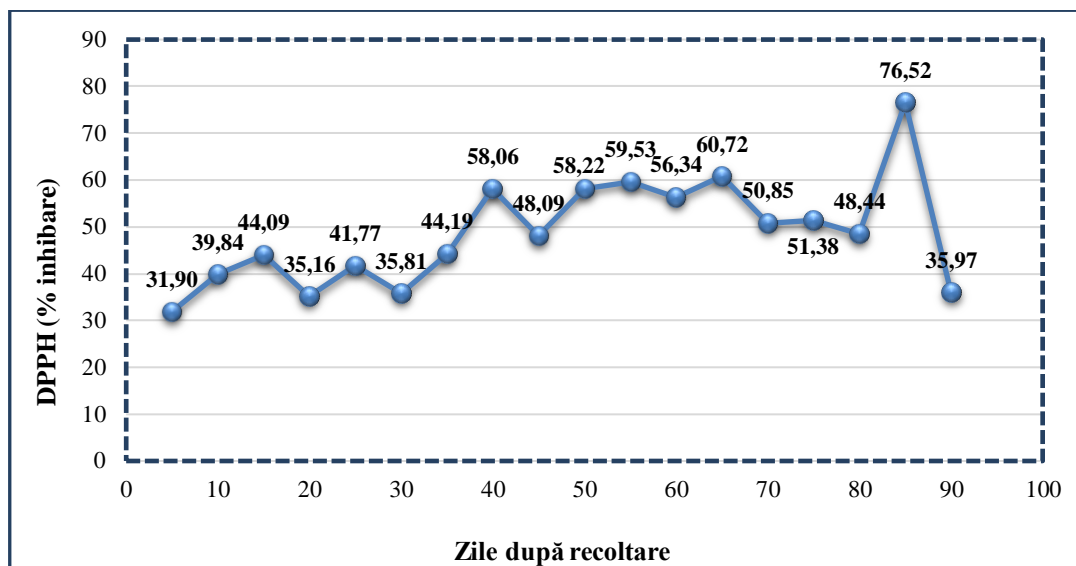


Fig. 4.5. Inhibarea %DPPH în lăstarii de viță de vie în timpul depozitării de 90 de zile după tăiere

Pentru a evidenția creșterea inhibării DPPH pe parcursul celor 90 de zile, rezultatele medii au fost calculate pentru 5 zile consecutive. Creșterea activității antioxidante urmează aceeași tendință ca și creșterea conținutului de resveratrol, diferența fiind că nivelul maxim de resveratrol s-a înregistrat cu 10 zile înainte de activitatea antioxidantă maximă, urmată de o scădere în ambele cazuri. Diferențele în ceea ce privește creșterea activității antioxidante și a *trans*-resveratrolului se pot datora altor polifenoli cu activitate antioxidantă al căror conținut poate crește, scădea sau rămâne constant în probele de lăstari de viță de vie [Ho,'15b] [Mo,'18]. Când probele sunt uscate, în ambele cazuri se înregistrează o scădere a conținutului. Această constatare poate fi corelată cu rezultatele lui Houillé et al. (2015), care au raportat că *trans*-resveratrolul și piceatanolul se acumulează până când țesuturile sunt uscate [Ho,'15b]. Această constatare este în acord cu lucrarea lui Guerrero et al. (2016), care au raportat că nu s-a observat nici o corelație între activitatea antioxidantă și conținutul total de stilbene datorită faptului că antioxidanții non-fenolici ar putea fi extrași din lăstarii de viță de vie și ar putea contribui la activitatea antioxidantă [Gu,'16].

4.5. Influența secționării probelor asupra creșterii *trans*-resveratrolului, a conținutului total de polifenoli și a activității antioxidante

Creșterea mare a conținutului de *trans*-resveratrol în perioada post-tăiere a fost evidențiată în multe studii din domeniu. Această creștere se datorează transcripției genei stilben sintazei indusă de metabolismul stilbenoid [Ho,'15b].

S-a constatat, de asemenea, că nivelul de inducție a fost modulat de temperaturile de depozitare. Pe baza proprietăților de inducție a genei STS, s-a emis ipoteza că o creștere a conținutului de stilbenoizi ar putea fi indus prin varierea factorilor externi de stres [Va,'12].

Datorită acestor constatări, s-a testat ipoteza conform căreia modul de depozitare al lăstarilor ar putea avea o influență asupra creșterii conținutului de resveratrol pe parcursul depozitării. Astfel, în momentul recoltării, probele au fost tăiate la diferite lungimi, de la bucăți mai mici de 1 cm, tăiate în secțiune, la probe de 10 cm și apoi păstrate la temperatura mediului ambiant (aproximativ 22 °C) timp de 6 săptămâni. În aceleași condiții s-a păstrat și o probă martor, netăiată. După acest timp, probele au fost măcinate, iar din fiecare probă s-a cântărit $5 \pm 0,001$ g, și apoi au fost macerate timp de 72 de ore cu soluție de etanol:dietil-eter într-un

raport de 4:1 (1 g de probă/5 ml de soluție) și apoi filtrate și analizate cu ajutorul cromatografului HPLC. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 4.3.

Tabel 4.3. Analiza variației conținutului de resveratrol, conținutului total de polifenoli și activitatea antioxidantă în probele de lăstari de viță de vie de lungimi diferite. Valori medii și abatere standard între paranteze

Parametru	Lungimea probelor								Valoare <i>F</i>
	<1 cm	1 cm	2 cm	3 cm	4 cm	5 cm	10 cm	Netăiat	
Resveratrol (mg/kg s.u.)	1667,49 (23,82) ^a	231,6 (3,31) ^d	509,92 (7,28) ^{cd}	525,285 (7,50) ^{cd}	618,67 (8,84) ^c	999,03 (14,27) ^b	1406,09 (20,09) ^{ab}	1641,64 (23,45) ^a	2619,29***
Conținutul total de polifenoli (mg GAE/g s.u.)	22,03 (0,31) ^c	22,95 (0,41) ^c	22,14 (0,32) ^c	28,63 (0,44) ^a	35,55 (0,52) ^b	26,45 (0,43) ^b	24,75 (0,41) ^{bc}	29,03 (0,42) ^a	2963,32***
DPPH (%)	78,45 (1,12) ^a	52,725 (0,76) ^b	36,74 (0,52) ^c	39,255 (0,56) ^c	22,515 (0,32) ^e	32,135 (0,46) ^d	50,64 (0,72) ^b	52,195 (0,74) ^b	1225,19***

Tăierea probelor înainte de depozitare nu a dus la creșterea cantității de resveratrol acumulată pe perioada depozitării. Doar proba tăiată în bucăți mai mici de 1 cm a avut un conținut de resveratrol asemănător cu proba martor, cea netăiată. În cazul celorlate probe, tăiate la dimensiunea de 1cm, 2cm, 3cm, 4 cm, 5 cm, și 10 cm, s-a înregistrat un conținut de resveratrol mai scăzut ca în cazul probei netăiate.

Capitolul V, Cercetări experimentale privind optimizarea parametrilor de extracție a *trans-resveratrolului din deșeuri viticole*, prezintă rezultatele determinării parametrilor optimi pentru obținerea unui randament maxim de extracție pentru valorificarea economică și integrală a deșeurilor de viță de vie în vederea obținerii *trans-resveratrolului*. În acest studiu au fost utilizate diferite condiții de extracție: 35 de tipuri diferite de solvent, 10 variații ale raportului solid/lichid, 10 timpi de extracție, 10 tipuri de granulozitate a materialului măcinat și 7 extracții consecutive pe același material vegetal.

5.1. Selectarea tipului de solvent

Pentru a evalua eficacitatea solvenților pentru extracția *trans-resveratrolului*, cerința a fost ca solventul să conducă la obținerea unei concentrații ridicate din compusul studiat din lăstari de viță de vie. Analiza varianței (ANOVA) pentru conținutul de *trans-resveratrol* al extractelor este prezentată în tabelele 5.1 și 5.2.

Dintre solvenții cu etanol în diferite concentrații, solventul Et80% a facilitat extracția resveratrolului, obținându-se cea mai mare cantitate (66,86 mg/kg substanță uscată s.u.). Dintre solvenții cu metanol, solventul 99,9%Met a extras cea mai mare cantitate de resveratrol (84,06 mg/kg s.u.), depășind solventul 80%Et. Solvenții cu acetonă din seria 10-99,9% au extras cea mai mică cantitate de resveratrol comparativ cu toți solvenții utilizați. Prin adăugarea de 1% HCl la solventul metanol de 99,9% s-a îmbunătățit pozitiv cantitatea de resveratrol extrasă, atingând 92,06 mg/kg s.u. [Cr, '23]. Prin adăugarea a 19% apă la acest solvent, conținutul de resveratrol extras a scăzut. Dintre solvenții cu etanol:dietil-eter în rapoarte diferite s-a evidențiat raportul de 4:1, obținându-se cea mai mare concentrație de resveratrol (147,14 mg/kg s.u.), în comparație cu ceilalți solvenți (figura 5.2).

Tabel 5.1. Analiza varianței conținutului de *trans*-resveratrol pentru probele macerate cu diferiți solvenți. Valori medii și abatere standard în paranteze

Tip de solvent	Resveratrol (mg/kg s.u.)	Valoare <i>F</i>
Et 10%	0,29 (0,007) ^{af}	1×10 ⁷ ***
Et 20%	0,46 (0,024) ^{ae}	
Et 30%	1,27 (0,017) ^z	
Et 40%	1,58 (0,018) ^w	
Et 50%	3,11 (0,039) ^t	
Et 60%	3,28 (0,033) ^s	
Et 70%	18,51 (0,012) ^o	
Et 80%	66,86 (0,012) ^h	
Et 90%	39,00 (0,014) ^l	
Et 96%	55,11 (0,014) ^k	
Met 10%	0,44 (0,027) ^{ae}	
Met 20%	1,27 (0,028) ^z	
Met 30%	1,13 (0,024) ^{aa}	
Met 40%	0,95 (0,012) ^{ad}	
Met 50%	1,00 (0,010) ^{ac}	
Met 60%	1,93 (0,012) ^v	
Met 70%	5,73 (0,031) ^p	
Met 80%	33,86 (0,012) ^m	
Met 90%	75,30 (0,020) ^f	
Met 99,9%	84,06 (0,015) ^d	
Acet 10%	1,34 (0,014) ^y	
Acet 20%	1,48 (0,012) ^x	
Acet 30%	1,05 (0,011) ^{ab}	
Acet 40%	2,02 (0,012) ^u	
Acet 50%	1,94 (0,011) ^v	
Acet 60%	4,72 (0,018) ^r	
Acet 70%	4,90 (0,025) ^q	
Acet 80%	18,69 (0,018) ⁿ	
Acet 90%	66,46 (0,020) ⁱ	
Acet 99,9%	61,29 (0,012) ^j	
Met-HCl 99:1	92,06 (0,013) ^c	
Met-HCl-H ₂ O 1:88:19	67,84 (0,012) ^g	
Et-Diet 1:4	76,80 (0,009) ^e	
Et-Diet 1:1	92,12 (0,012) ^b	
Et-Diet 4:1	147,14 (0,011) ^a	

^{a-z} – litere diferite în aceeași coloană indică diferențe semnificative între probe ($p < 0,0001$) conform testului LSD cu $\alpha = 0,05$. Et – etanol, Met – metanol, Acet – acetonă, Et-Diet – etanol:dietil-eter.

Table 5.2. Analiza varianței conținutului de *trans*-resveratrol pentru probele de lăstari de viță de vie extrase cu diferite proporții de lichid/solid, pentru diferiți timpi de macerare cu diferite dimensiuni ale particulelor. Valori medii și abatere standard în paranteze

Raport solid/lichid (g/ml)	Resveratrol (mg/kg s.u.)	Valoare <i>F</i>	Timp de macerare (zile)	Resveratrol (mg/kg s.u.)	Valoare <i>F</i>	Dimensiune a particulelor	Resveratrol (mg/kg s.u.)	Valoare <i>F</i>
1:05	19,76 (0,012) ^j	4,57 × 10 ^{6***}	1	1,40 (0,017) ^j	1,83 × 10 ^{7***}	>1000 μm	35,78 (0,008) ⁱ	2,11 × 10 ^{7***}
1:10	20,18 (0,021) ^j		2	75,48 (0,012) ^j		1000-710 μm	43,7 (0,017) ^e	
1:15	25,51 (0,013) ^h		3	142,16 (0,007) ^e		710-630 μm	48,19 (0,015) ^d	
1:20	28,12 (0,009) ^g		4	167,74 (0,010) ^a		630-500 μm	92,78 (0,010) ^b	
1:25	31,68 (0,010) ^f		5	152,48 (0,014) ^b		500-350 μm	205,16 (0,014) ^a	
1:30	32,44 (0,017) ^e		6	148,55 (0,011) ^c		350-250 μm	66,28 (0,013) ^c	
1:35	43,91 (0,012) ^a		7	146,96 (0,017) ^d		250-200 μm	43,48 (0,012) ^f	
1:40	38,28 (0,011) ^b		8	135,42 (0,008) ^f		200-180 μm	38,69 (0,006) ^h	
1:45	35,66 (0,014) ^d		9	123,24 (0,025) ^g		180-125 μm	41,91 (0,011) ^g	
1:50	35,79 (0,015) ^c		10	100,42 (0,011) ^h		<125 μm	23,67 (0,009) ⁱ	

^{a-j} – litere diferite în aceeași coloană indică diferențe semnificative între probe ($p < 0,0001$) conform testului LSD cu $\alpha = 0,05$.

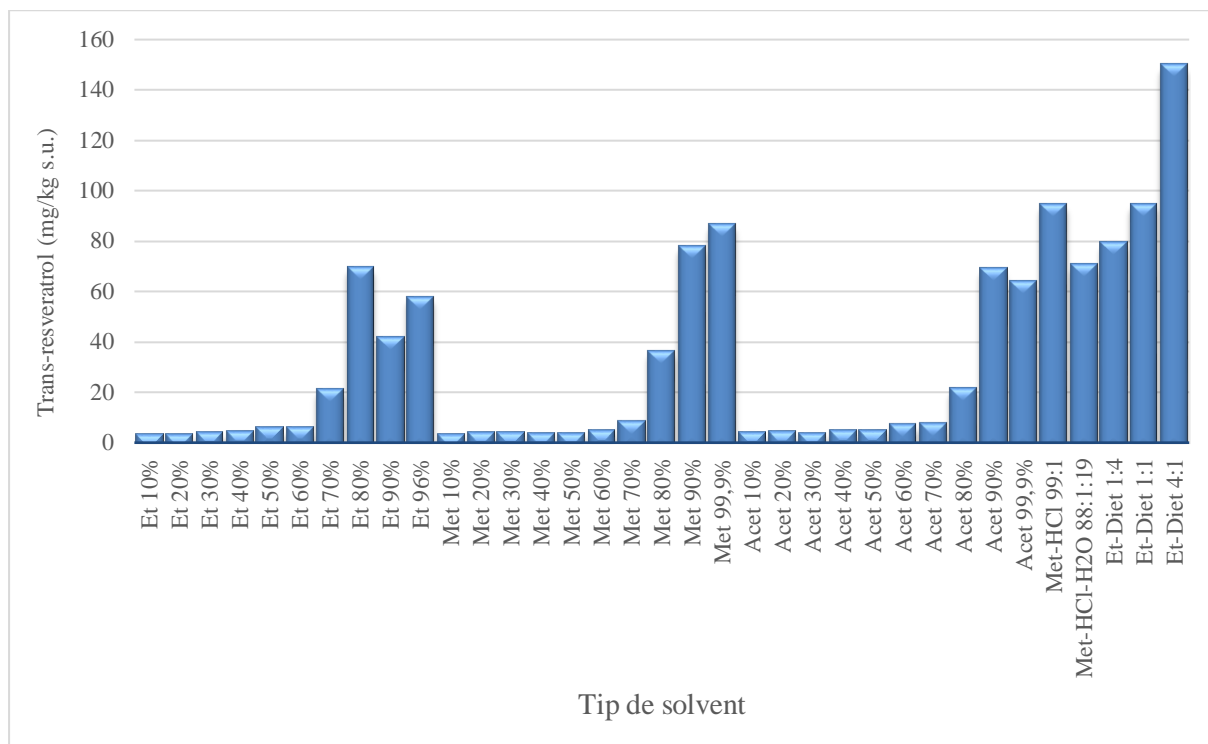


Fig. 5.2. Conținutul de resveratrol din extractele de lăstari de viță de vie din soiul Fetească Neagră obținute cu diferite tipuri de solvent vie (Et – etanol, Met – metanol, Acet – acetonă, Et-Diet – etanol:dietil-eter)

5.2. Raportul solid/lichid

În prezentul studiu s-au testat diferite rapoarte de extracție solid/lichid în extracția resveratrolului din lăstari de viță de vie pentru a identifica raportul optim care va genera un extract cu un concentrație cât mai mare de resveratrol. După cum se poate observa în figura 5.3, raportul solid/lichid de 1:35 mg/l s-a dovedit a fi optim pentru extracția resveratrolului, obținându-se cea mai mare concentrație a acestui compus. Acest fapt este confirmat de rezultatele obținute pentru celelalte extracții, care au arătat o creștere a conținutului de resveratrol de la raportul solid/lichid 1:5 mg/l la raportul solid/lichid 1:35 mg/l, iar ulterior a scăzut, până la raportul solid/lichid 1:50 mg/l.

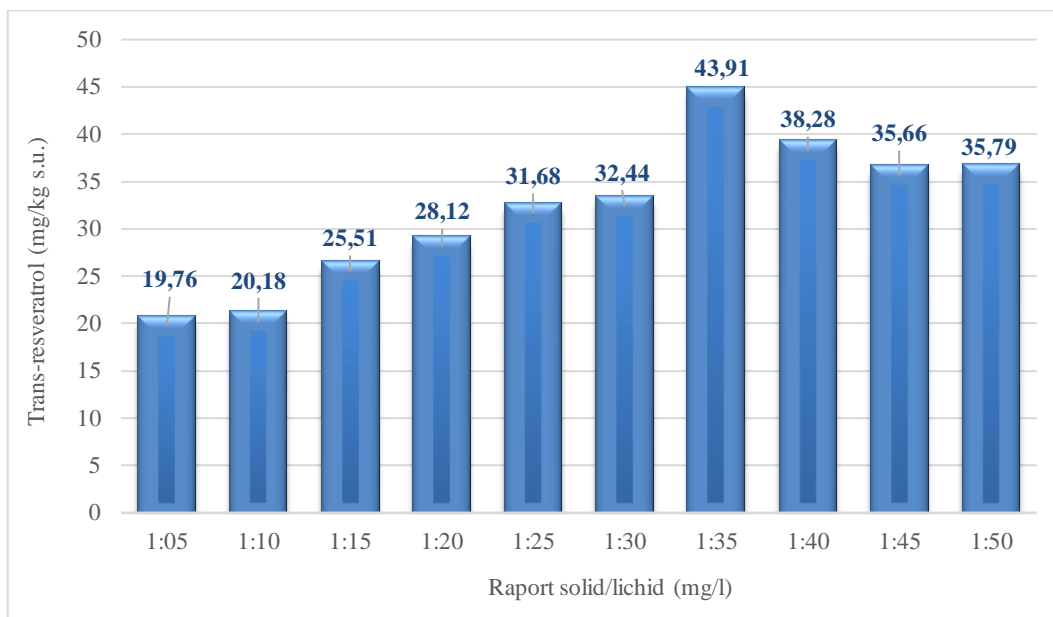


Fig. 5.3. Concentrația resveratrolului din extractele de lăstari de viță de vie pentru diferite raporturi solid/lichid

5.3. Timpul de macerare

Figura 5.4 este evidențiată diferența mare a concentrației extractelor de lăstari de viță de vie în funcție de timpul de extracție. După o zi, concentrația resveratrolului din extract a fost cea mai mică. Conținutul de resveratrol al extractului obținut în ziua a 3-a a avut valoare dublă față de cel din ziua precedentă. Cea mai mare concentrație de resveratrol a fost obținută în ziua a 4-a – 167,74 mg/kg s.u. După a 4-a zi, concentrația resveratrolului din extract a scăzut, tendință observată și pentru următoarele zile.

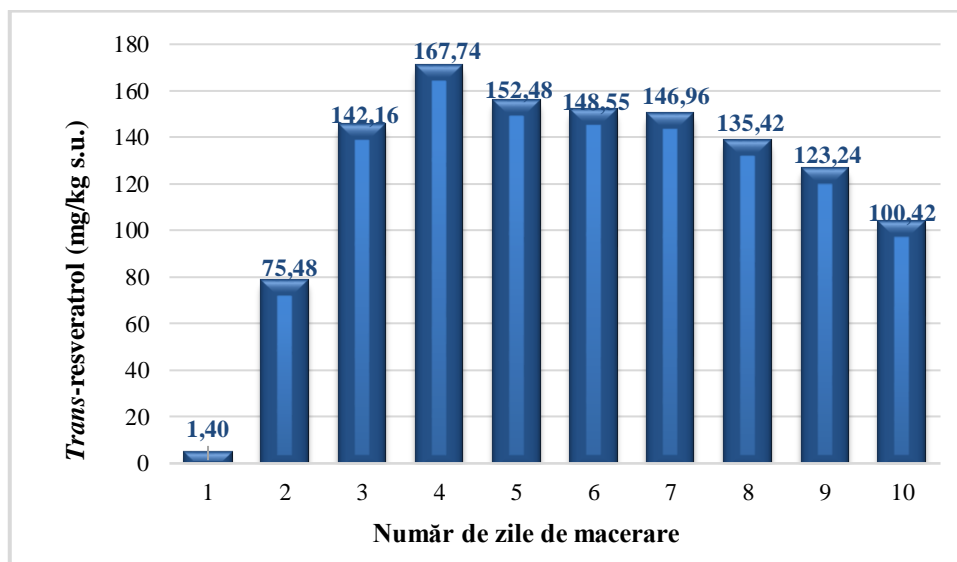


Fig. 5.4. Conținutul de resveratrol din extractele de lăstarii de viță de vie pentru diferite perioade de macerare

5.4. Selectarea dimensiunii particulelor

Micșorarea dimensiunii particulelor ar trebui să crească suprafața superficială disponibilă pentru transferul de masă și ca urmare să ducă la creșterea randamentului de extracție [Sp'07]. Particulele celulozice obținute prin măcinare au fost sitate utilizând 9 site cu diferite dimensiuni ale ochiurilor și au fost macerate în aceleași condiții și cu același solvent pentru a determina dacă dimensiunea particulelor de probă influențează concentrația *trans*-resveratrolului din extractele obținute (figura 5.5).

Figura 5.6 arată că sunt diferențe semnificative de concentrație în funcție de dimensiunea particulelor, obținându-se o concentrație maximă de resveratrol (205,16 mg/kg s.u.) pentru o granulozitate de 500-350 μm . Cea mai mică concentrație de resveratrol (23,67 mg/kg s.u.) a fost înregistrată pentru materialul vegetal cu cea mai mică granulozitate, <125 μm . Acest lucru este în contradicție cu ipoteza că o suprafață de transfer de masă mai mare va duce la obținerea unei concentrații mai ridicate. Compoziția chimică a lăstarilor de viță de vie se caracterizează printr-o fracțiune de holoceluloză de aproximativ 55,1% (31,9% α -celuloză și 23,2% hemiceluloză) și o altă fracțiune de lignină, de aproximativ 38,5% [Ce,'17]. Aceste diferențe în conținutul de resveratrol extras pot fi atribuite neuniformității structurii chimice în compoziția lăstarilor. Acest rezultat evidențiază faptul că nu este necesar ca materialul solid să fie măcinat fin pentru a obține extracte cu o concentrație mare de resveratrol. Astfel, în procesul de obținere a *trans*-resveratrolului din lăstarii de viță de vie, măcinarea materialului se poate face printr-un proces de economisire a energiei prin măcinarea materialului până la 350 μm .

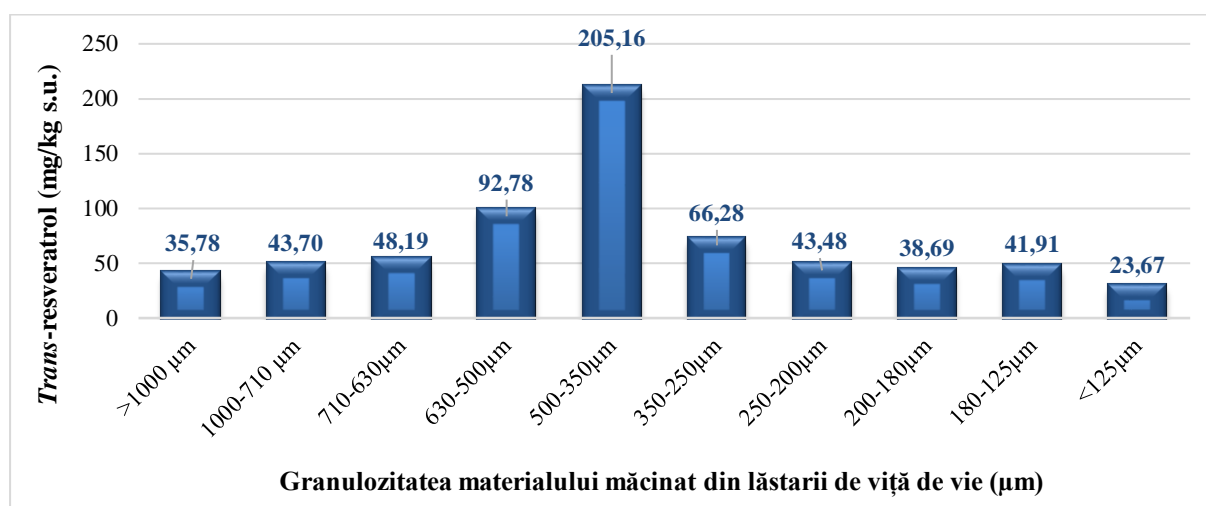


Fig. 5.6. Conținutul de resveratrol extras din probele de lăstari de viță de vie pentru diferite granulozități ale materialului sub formă de pulbere

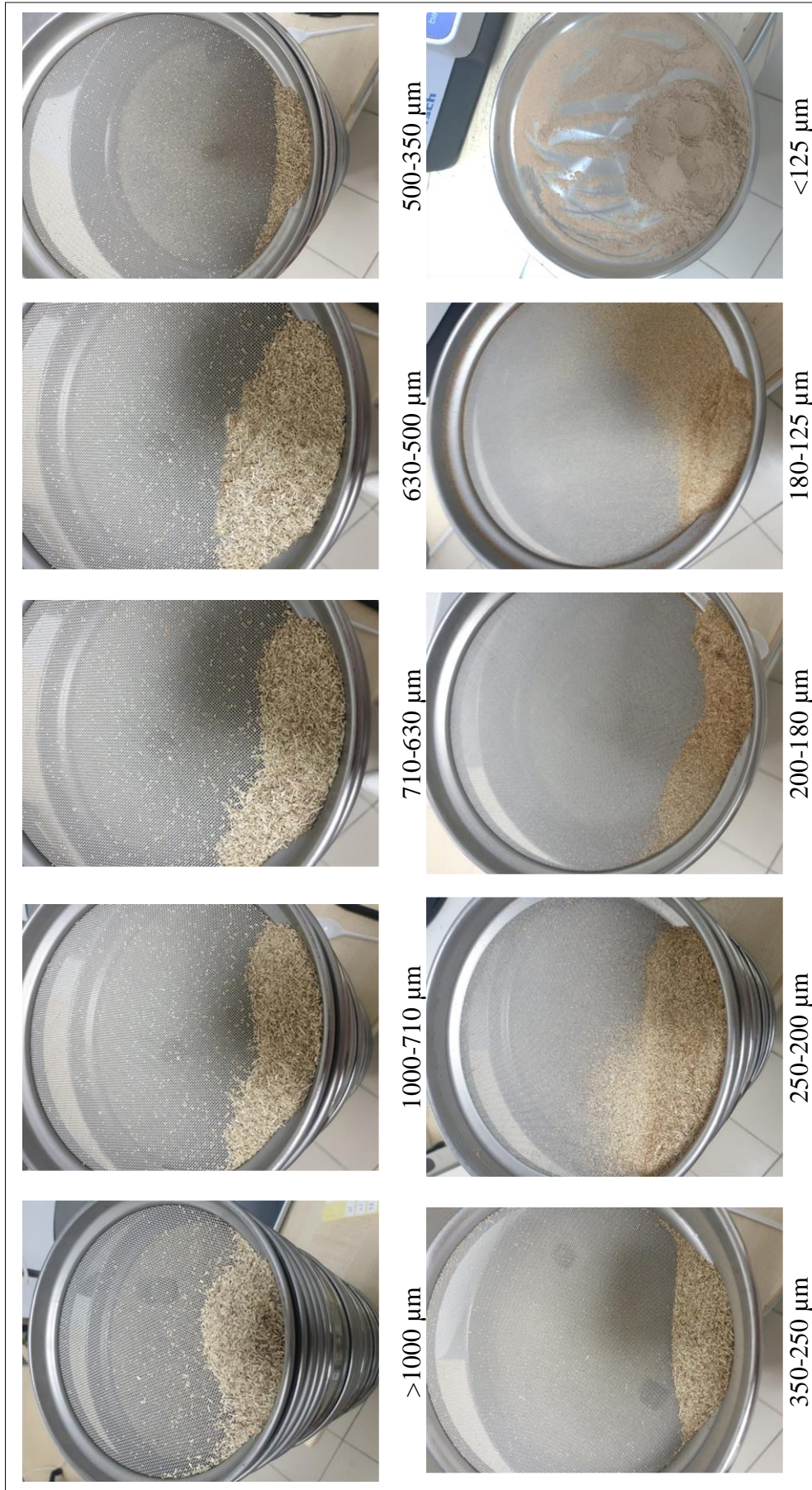


Fig. 5.5. Tipuri de granulozitate

5.5. Numărul de extracții pe același material

Pe același material s-au efectuat 7 extracții ca o încercare de a crește cantitatea totală de resveratrol extrasă și de a reduce pierderile prin recuperarea oricărei cantități de resveratrol care nu a putut fi extrasă în prima etapă. După a doua extracție s-a obținut 12,66 mg/kg s.u. resveratrol, această cantitate reprezentând doar 5% din cantitatea extrasă în prima etapă. În cea de-a treia etapă conținutul de resveratrol a fost doar de 0,67% raportat la prima extracție. Pentru următoarele patru extracții conținutul de resveratrol a fost sub limita de detecție (figura 5.7). Din punct de vedere economic extracțiile ulterioare pe același material nu sunt avantajoase. Utilizarea solvenților, timpul și practica de lucru nu sunt economice pentru a doua și a treia extracție, care însumează doar 5,67% raportat la conținutul de resveratrol obținut în prima extracție.

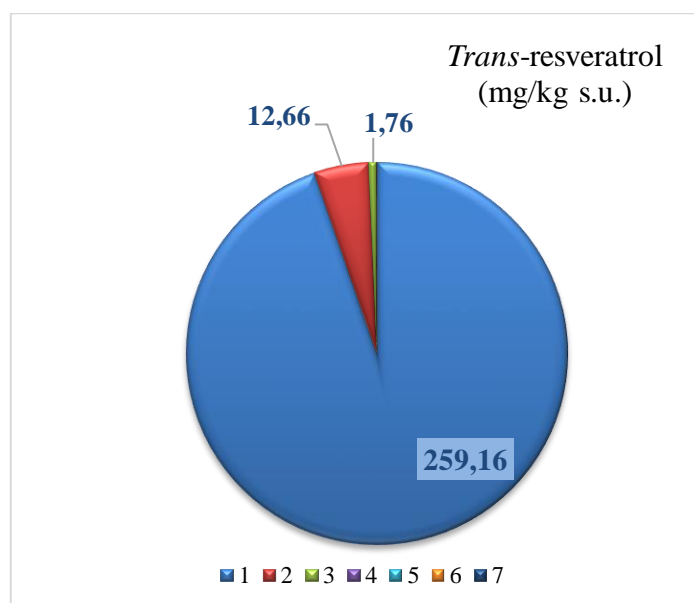


Fig. 5.7. Conținutul de resveratrol din extractele de lăstari de viță de vie după 7 extracții pe același material

5.6. Optimizarea parametrilor de extracție

Acest experiment a fost efectuat conform design-ului Box-Behnken bazat pe metodologia suprafețelor de răspuns. Fiecare variabilă independentă (raport solid/lichid, timp și dimensiunea particulelor) a fost distribuită pe 3 niveluri, după cum urmează: raport solid/lichid (1:20, 1:35 și 1:50 g/ml), timp (2, 4 și 6 zile) și dimensiunea particulelor (>1000 μm, 500-350 μm și <125 μm). Design-ul experimental a fost realizat utilizând Design Expert 12 (versiunea de încercare, Stat-Ease Inc., Minneapolis, Statele Unite ale Americii).

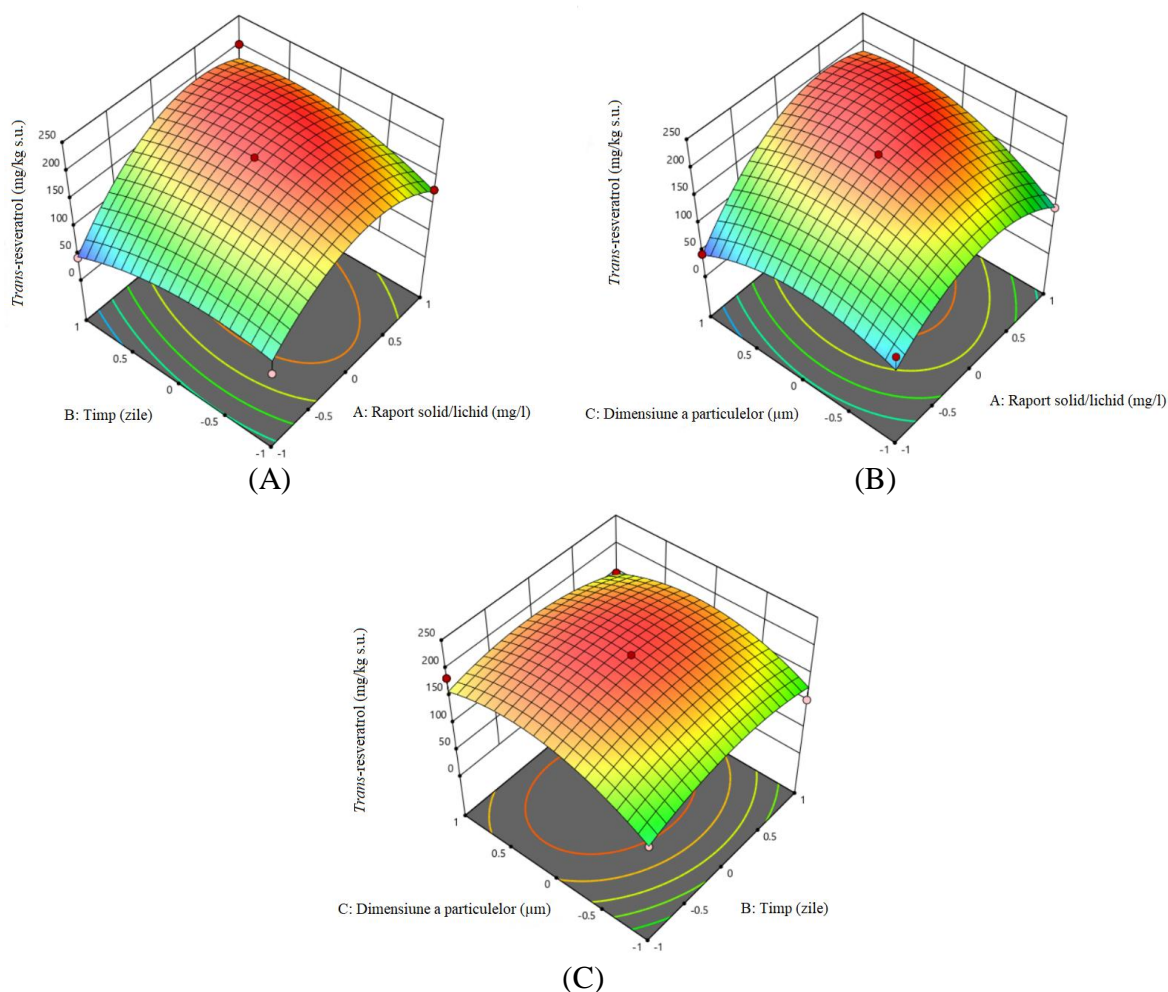


Fig. 5.8. Reprezentarea suprafețelor de răspuns pentru efectul combinat al factorilor: (A) timp și raport solid/lichid, (B) dimensiune a particulelor și raport solid/lichid și (C) dimensiune a particulelor și timp asupra conținutului de resveratrol din lăstarii de viță de vie.

Conform figurii 5.8, cel mai mare conținut de *trans-resveratrol* (148,55 mg/kg s.u.) s-a observat la corelarea valorilor următorilor parametri: 1:35 g/ml raport solid/lichid, timp de 4 zile și dimensiune a particulelor de 500-350 µm utilizând ca solvent de extracție etanol:dietil-eter în raport de 4:1. Astfel, valoarea experimentală pentru concentrația resveratrolului este similară cu cea prezisă de către modelul experimental (205,16 mg/kg s.u.).

Capitolul VI, Extracția resveratrolului prin tratamentul acid și alcalin, cuprinde rezultatele obținute în urma aplicării tratamentelor acide și alcaline pe lăstarii de viță de vie în vederea extracției *trans-resveratrolului*. Tratamentul acid sau alcalin este utilizat în general în extracțiile pe materiale vegetale pentru a pune în libertate anumite substanțe din compoziția acestora, substanțe ce nu pot fi extrase decât printr-o prealabilă rupere a legăturilor chimice existente.

Conținutul de resveratrol al extractelor obținute în urma tratamentelor acide sau alcaline sunt prezentate în tabelul 6.1 și 6.2.

Tabel 6.1. Conținutul de resveratrol obținut în urma tratamentului acid. Valori medii și abatere standard în paranteze

Agent de pretratare	Resveratrol (mg/kg s.u.)			Valoare <i>F</i>
	Raport solid/lichid (g/ml)			
	1:20	1:25	1:30	
Acid sulfuric 1%	0 ^d	0 ^d	0 ^d	1855,88***
Acid sulfuric 2%	0 ^d	0 ^d	0 ^d	
Acid sulfuric 3%	0 ^d	0,37 (1,16) ^d	0 ^d	
Acid clorhidric 1%	0 ^d	0 ^d	0 ^d	
Acid clorhidric 2%	0 ^d	0 ^d	0 ^d	
Acid clorhidric 3%	19,27 (0,07) ^c	23,37 (0,24) ^a	21,58 (0,18) ^b	
Acid fosforic 1%	0 ^d	0 ^d	0 ^d	
Acid fosforic 2%	0 ^d	0 ^d	0 ^d	
Acid fosforic 3%	0 ^d	0,45 (1,12) ^d	0,07 (1,27) ^d	

^{a-d} – litere diferite în aceeași coloană indică diferențe semnificative între probe ($p < 0,0001$) conform testului LSD cu $\alpha = 0,05$.

Tabel 6.2. Conținutul de resveratrol obținut în urma tratamentului alcalin. Valori medii și abatere standard în paranteze

Agent de pretratare	Resveratrol (mg/kg s.u.)			Valoare <i>F</i>
	Raport solid/lichid (g/ml)			
	1:20	1:25	1:30	
Hidroxid de sodiu 1%	10,38 (0,72) ^c	6,53 (1,16) ^d	3,89 (0,18) ^{gh}	296,2***
Hidroxid de sodiu 2%	2,50 (0,24) ⁱ	1,16 (0,37) ^j	1,14 (0,72) ^j	
Hidroxid de sodiu 3%	0,25 (0,09) ^k	0 ^k	0 ^k	
Hidroxid de potasiu 1%	16,44 (0,47) ^b	18,44 (0,15) ^a	10,41 (0,68) ^c	
Hidroxid de potasiu 2%	7,22 (1,12) ^d	6,50 (0,96) ^d	5,40 (0,41) ^e	
Hidroxid de potasiu 3%	4,87 (0,28) ^{ef}	4,50 (0,13) ^{fg}	3,28 (0,78) ^{hi}	

^{a-k} – litere diferite în aceeași coloană indică diferențe semnificative între probe ($p < 0,0001$) conform testului LSD cu $\alpha = 0,05$.

În cazul tratamentelor acide s-au obținut rezultate doar în cazul utilizării acizilor clorhidric, fosforic și sulfuric de concentrație 3%. Cea mai mare concentrație de resveratrol a fost obținută când a fost utilizat acidul clorhidric 3%, pentru raportul solid/lichid de 1:25 g/ml, înregistrându-se o valoare de 23,37 mg/kg s.u. Resveratrolul a fost identificat în concentrații scăzute când acidul fosforic 3% (raport solid/lichid de 1:25 și 1:30 mg/l) și acidul sulfuric 3% (raport solid/lichid de 1:25 mg/l) au fost utilizați ca și agenți de tratare.

În cazul tratamentului bazic, resveratrolul a fost identificat în aproape toate probele. Rezultatele au evidențiat faptul că tratamentul cu hidroxid de potasiu 1% (raport solid/lichid de 1:25 mg/l) a fost mult mai eficient decât cel cu hidroxid de sodiu, obținându-se o concentrație de 18,44 mg/kg s.u. resveratrol. Cele mai mari concentrații de resveratrol au fost obținute pentru soluțiile alcaline de 1%, iar odată cu creșterea concentrației solventului, conținutul de resveratrol a scăzut în toate cazurile.

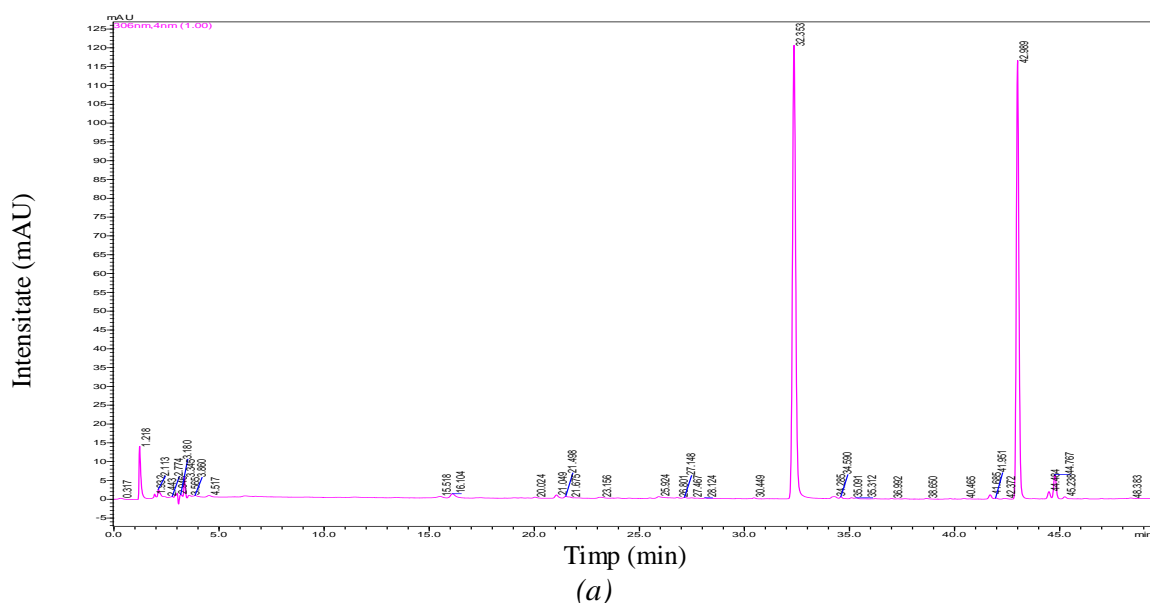
În urma tamentului acid s-au obținut valori ale concentrației de resveratrol mai mari decât în cazul tratamentului alcalin. Se poate observa că în cazul tratamentului acid creșterea conținutului de resveratrol este direct proporțională cu creșterea concentrației de acid, iar în probele tratate alcalin se constată că o concentrație de 1% a fost optimă pentru o valoare maximă de resveratrol. Concentrații mai mari de 1% soluții bazice diminuează semnificativ cantitatea acestui compus.

Rezultatele obținute demonstrează faptul că resveratrolul poate fi extras utilizând această metodă, dar nu este recomandată deoarece randamentele de extracție sunt mult mai mici decât în cazul utilizării solvenților alcoolici (etanol, metanol și dietil-eter). De asemenea, agenții de tratament și metoda de extracție sunt costisitori și dăunează mediului înconjurător.

Capitolul VII, Metode de pre-purificare a extractului de lăstari de viță de vie prezintă rezultatele obținute în urma aplicării a 3 metode diferite de purificare pe extractele de lăstari de viță de vie, metode precum: spălarea extractului cu soluție de bicarbonat de sodiu 5% în pâlnia de separare, efectuarea unei extracții apoase înainte de extracția propriu-zisă cu solvent și extracția resveratrolului cu benzoat de benzil.

Extracția lichid-lichid cu soluție cu bicarbonat de sodiu 5% și dietil-eter a generat un extract cu o puritate mai ridicată, de 78,49% și cu o pierdere de 18,54% resveratrol în timpul procesului. Extractul inițial a avut un conținut de 45,47% resveratrol. Puritya resveratrolului a fost calculată pe baza ariei peak-urilor astfel: suma ariei tuturor peak-urilor reprezintă 100%, iar aria peak-ului ce corespunde resveratrolului a fost calculată ca procent din totalul de 100%. Toate celelalte peak-uri au fost calculate drept impurități din extract. Pierderea resveratrolului din timpul procesului a fost calculată prin determinarea concentrației de resveratrol din probă înainte și după etapa de spălare cu soluție de bicarbonat de sodiu. Concentrația de resveratrol din extract inițial a fost de 792,29 mg/kg s.u., iar după spălarea cu soluție de bicarbonat de sodiu a fost de 645,4 mg/kg s.u.

De asemenea, s-a constatat și modificarea culorii celor doi solvenți implicați în extracția lichid-lichid, astfel faza apoasă de bicarbonat de sodiu s-a colorat în brun, iar stratul de dietil-eter a devenit mai limpede și a avut culoarea galben-verzui. Acest lucru a fost confirmat și de analizele HPLC la 306 nm, după cum se poate observa în figura 7.1. Cromatograma extractului spălat cu bicarbonat de sodiu a conținut mai puține impurități, iar o parte din peak-urile din prima analiză nu s-au regăsit în a doua cromatogramă.



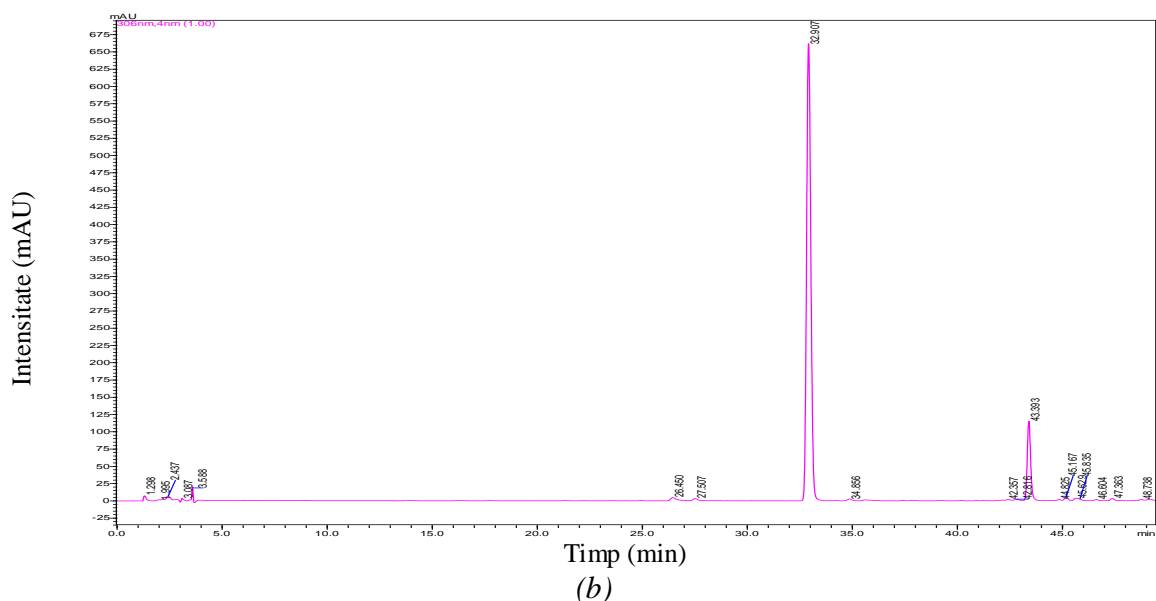


Fig. 7.1. Cromatogramele extractului de lăstari de viță de vie (a) înainte și (b) după spălarea cu soluție de bicarbonat de sodiu 5%

Extracția apoasă a fibrelor celulozice de lăstari de viță de vie înainte de extracția cu solventul propriu-zis nu a reușit reducerea impurităților din extract. În schimb, s-a înregistrat o pierdere ridicată a resveratrolului, astfel extractul a avut un conținut de doar 29,66% resveratrol. Această extracție apoasă a scăzut extractibilitatea resveratrolului din materialul vegetal analizat. Deși a influențat negativ randamentul extracției de resveratrol, au fost identificate diferențe vizuale de culoare și turbiditate între extracte, astfel în urma extracției cu apă, extractul cu solvent a avut culoarea galben deschis și a fost mult mai limpede față de extractul simplu cu solvent.

În literatura de specialitate benzoatul de benzil este un solvent selectiv pentru extracția resveratrolului din mediile celulare de viță de vie. Deși metoda este utilizată cu succes, aceasta nu are aplicabilitate pe extractele de resveratrol din lăstarii de viță de vie deoarece extracția resveratrolului din amestec nu poate fi realizată.

Capitolul VIII, Metode de purificare avansată cu materiale specializate a extractelor de lăstari de viță de vie, sunt prezentate rezultatele obținute în urma purificării extractelor de lăstari de viță de vie cu ajutorul materialelor specializate precum: Silicagel G60, rășini hidrofobe nefuncționalizate Amberlite XAD 2 și Amberlite XAD 16 și rășină pe bază de dextran Sephadex LH-20.

Purificarea cu ajutorul materialului Silicagel G60 nu a reușit îmbunătățirea purității extractului, în schimb a generat o pierdere de 15,47% de resveratrol din extract.

În studiul comparativ realizat pe două tipuri diferite de rășini hidrofobe nefuncționalizate, Amberlite XAD 2 și Amberlite XAD 16, primul tip de rășină s-a remarcat în ceea ce privește gradul de purificare al extractelor din lăstari de viță de vie. Astfel, prin purificarea extractului prin coloana umplută cu rășina Amberlite XAD 2 s-a obținut o fracție care conținea resveratrol de puritate 87,26%, cu o pierdere a resveratrolului de 29,71% față de cantitate inițială. În schimb, în urma purificării extractului prin coloana cu rășină Amberlite XAD 16 s-a obținut o fracție care conținea resveratrol de puritate 79,55%, cu o pierdere a resveratrolului de 47,53% față de cantitate inițială. Puritatea resveratrolului a fost calculată pe baza ariei peak-urilor astfel: suma ariei tuturor peak-urilor reprezintă 100%, iar aria peak-ului ce corespunde resveratrolului a fost calculată ca procent din totalul de 100%. Toate celelalte peak-uri au fost calculate drept impurități din extract. Pierdere resveratrolului din timpul procesului a fost calculată prin

determinarea concentrației de resveratrol din probă înainte și după trecerea prin coloanele cu rășină Amberlite. Concentrația de resveratrol din extract inițial a fost de 792,29 mg/kg s.u., după trecerea prin coloana cu rășină Amberlite XAD 2 a fost de, 556,94 mg/kg s.u., iar după trecerea prin coloana cu rășină Amberlite XAD 16 a fost de 415,72 mg/kg s.u.

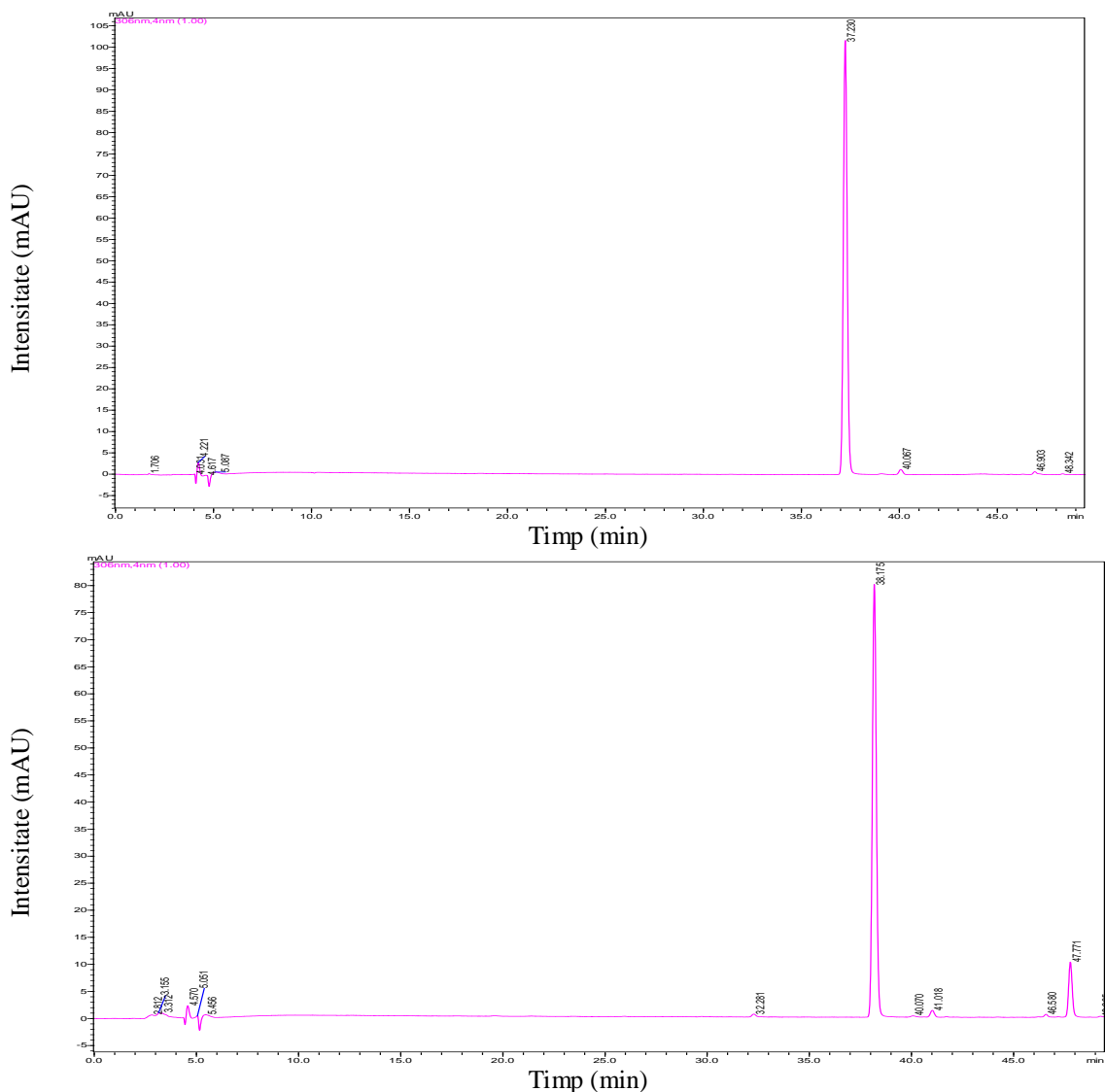
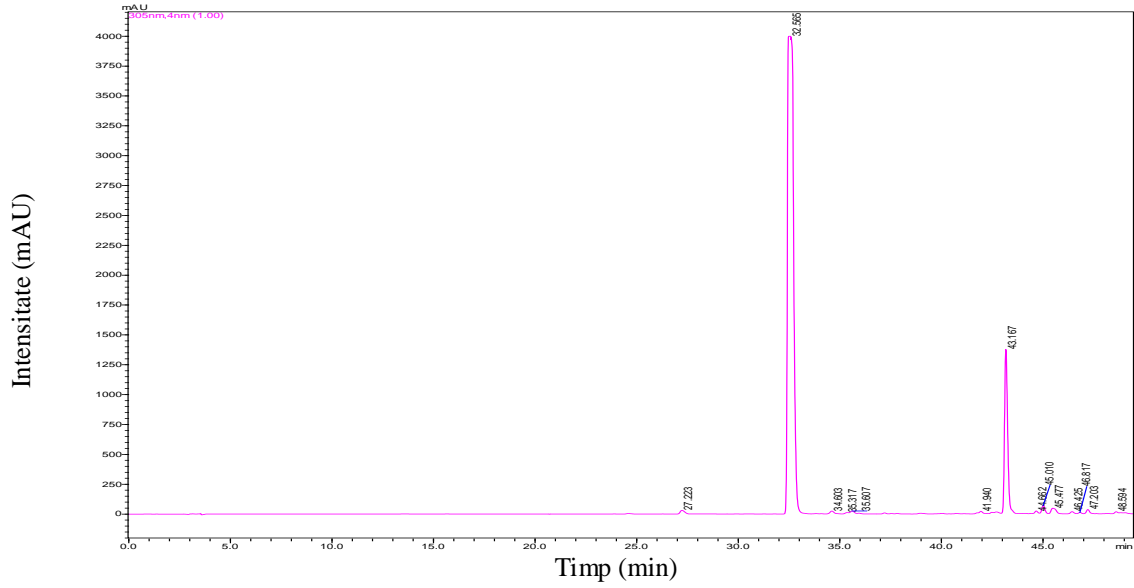
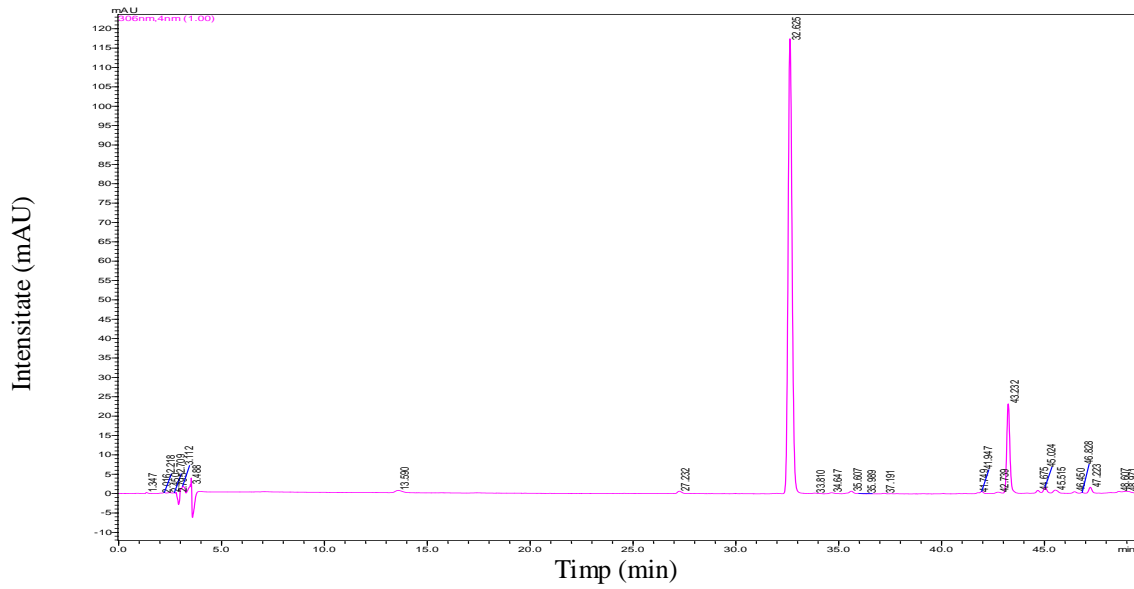


Fig. 8.2. Cromatogramele obținute pentru extractele din lăstari de viță de vie purificate cu rășini hidrofobe (a) Amberlite XAD 2 și (b) Amberlite XAD 16

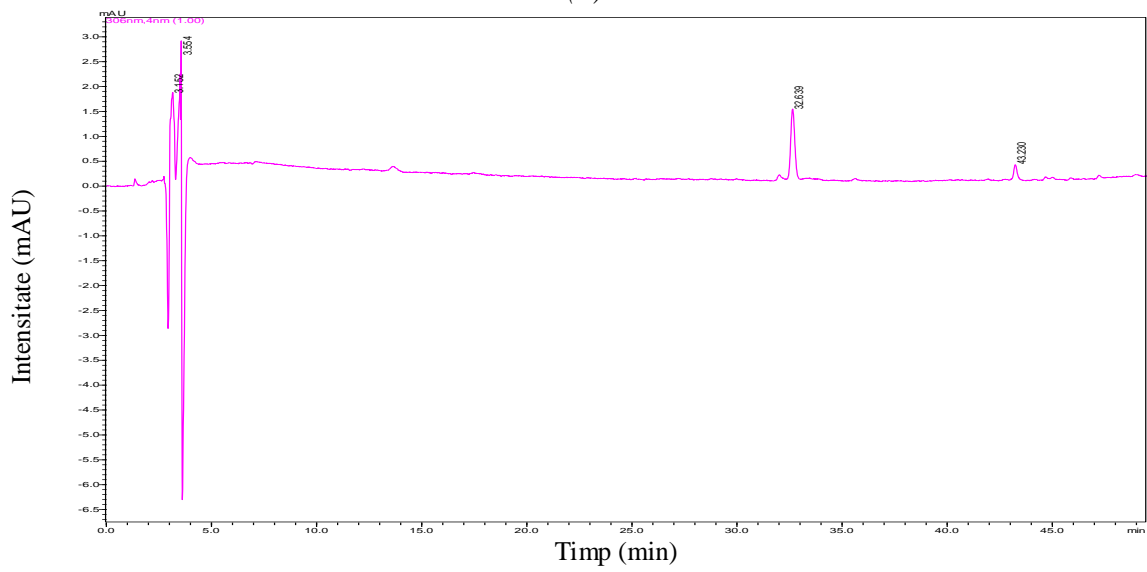
Trecerea aceluiași extract de trei ori prin coloane cu rășină Amberlite XAD 2 a avut ca scop determinarea eficienței adsorbției resveratrolului de către granulele de rășină. Având în vedere că a doua fracție a conținut 0,38% resveratrol raportat la prima purificare, iar a treia fracție a conținut 0,005% resveratrol raportat la prima purificare, s-a stabilit faptul că adsorbția resveratrolului se realizează eficient la prima trecere prin coloană și nu sunt pierderi semnificative. Astfel, doar o mică cantitate de resveratrol a rămas în extractul care a trecut prin coloană. O singură purificare prin coloană este suficientă pentru purificarea extractului.



(a)



(b)



(c)

Fig. 8.3. Cromatogramele obținute pentru extractului de lăstari de viță de vie (a) după prima purificare pe coloană cu rășină Amberlite XAD 2, (b) după a doua purificare și (c) după a treia purificare

Cantități diferite de extract au fost purificate cu același material de coloană Amberlite XAD 2 pentru a determina cantitatea optimă la care se poate obține o fracție cât mai pură. La purificarea a 50 ml extract s-a obținut o fracție cu puritatea de 89,49%. Puritatea fracțiilor a scăzut în momentul creșterii cantității de extract, ajungând până la 84,21% pentru 300 ml extract. Scăderea purității fracției nu este semnificativă având în vedere că s-a utilizat o cantitate de 6 ori mai mare de extract.

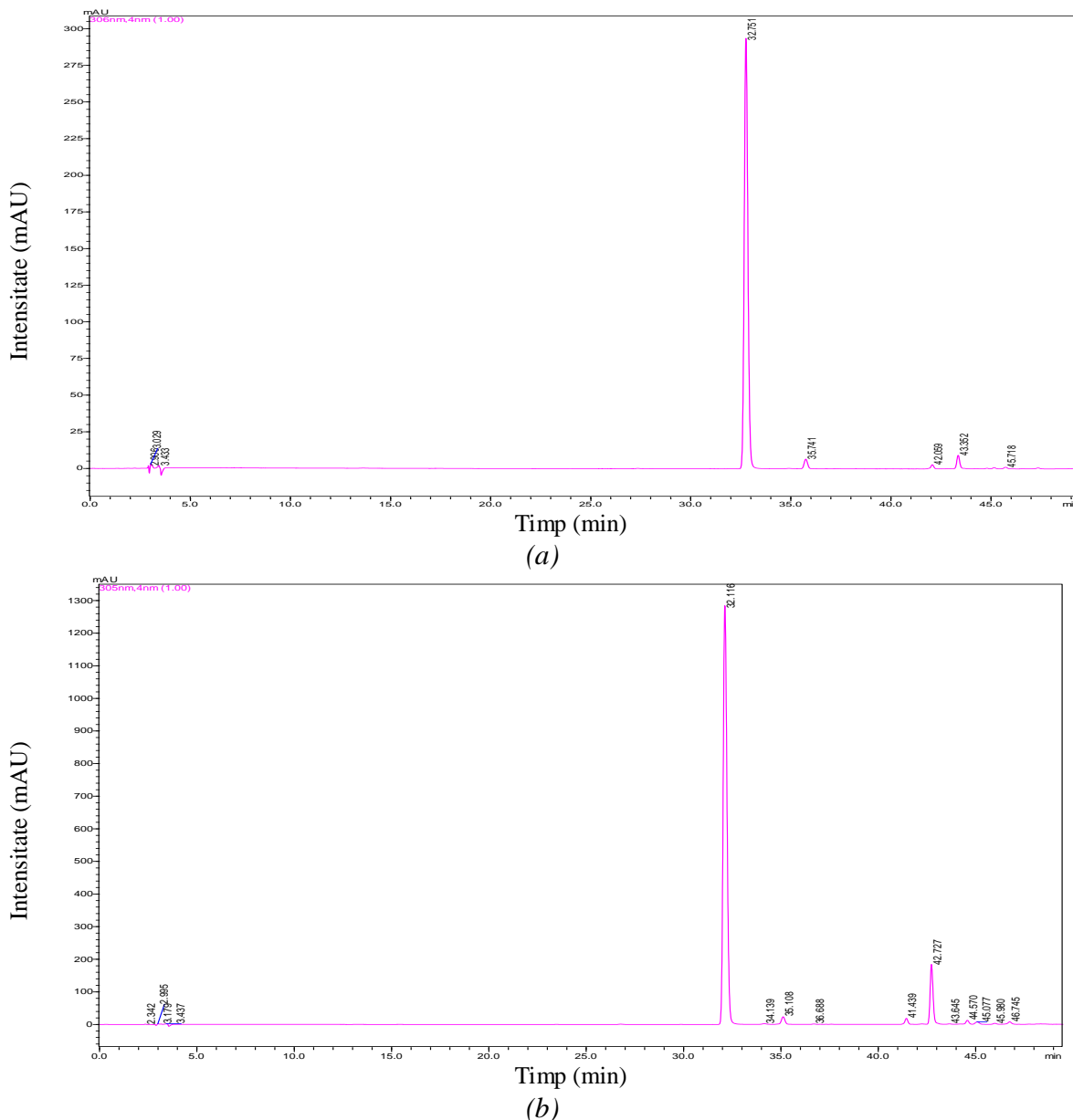


Fig. 8.4. Cromatogramele obținute pentru extractele de lăstari de viță de vie după purificare pe coloana de rășină Amberlite XAD 2 (a) pentru 50 ml extract și (b) pentru 300 ml extract

Purificarea extractelor pe coloana cu umplutură specializată Sephadex LH-20 nu a generat o fracție mai pură de resveratrol, cromatogramele fiind aproape identice.

Capitolul Concluzii generale prezintă concluzii generale ale cercetărilor realizate în această teză de doctorat.

În teza de doctorat intitulată „CERCETĂRI ȘI CONTRIBUȚII PRIVIND FOLOSIREA DEȘEURILOR VITICOLE LA OBTINEREA RESVERATROLULUI DE ÎNALTĂ PURITATE DESTINAT INDUSTRIEI ALIMENTARE ȘI CELEI DE MEDICAMENTE” s-a urmărit ca studiile teoretice și cele experimentale efectuate să contribuie la nivelul actual de dezvoltare și de cunoaștere în domeniul obținerii resveratrolului de înaltă puritate din lăstarii de viță de vie.

Această teză de doctorat subliniază importanța valorificării deșeurilor viticole în vederea obținerii resveratrolului de înaltă puritate, atât datorită faptului că piața suplimentelor alimentare este într-o continuă creștere și cererea este tot mai mare, cât și din prisma valorificării acestor deșeuri care în momentul de față sunt eliminate prin ardere, având un impact negativ asupra mediului înconjurător. Din concluziile prezentate la finalul fiecărui capitol și din rezultatele obținute prin cercetările efectuate rezultă următoarele concluzii generale:

- Resveratrolul este un compus fenolic cu efect antioxidant și este comercializat ca supliment alimentar începând din anul 2012 datorită efectelor benefice dovedite asupra organismului uman, care includ: antiviral, antiinflamator, antioxidant, cardioprotector, neuroprotector, protejează împotriva ischemiei, infecțiilor, cancerului, previne îmbătrânirea și reduce obezitatea. Din anul 2016 acesta a fost autorizat ca ingredient alimentar nou în Uniunea Europeană.

- Majoritatea suplimentelor alimentare pe bază de resveratrol sunt obținute din rădăcina de trestie japoneză *Polygonum cuspidatum*. Studii recente au indicat faptul că extractele obținute ar putea conține și alți compuși pe lângă resveratrol, de exemplu emodina, precum și faptul că siguranța preparatelor ar fi îndoielnică datorită faptului că trestia japoneză crește în medii puternic poluate.

- Având în vedere că în industria vinului și în sectorul viticol sunt generate cantități mari de deșeuri vegetale precum materiale lignocelulozice și tescovină, obținerea resveratrolului din aceste surse vegetale este utilă din punct de vedere a gestionării deșeurilor și sub aspect economic.

- Într-o primă etapă s-a determinat conținutul de resveratrol din diferite sortimente de vin de pe piața din România în scopul evidențierii prezenței acestui compus în produsele vitivinicole. Probele analizate au prezentat cantități de resveratrol care au variat între 0,04 și 6,64 mg/l, cea mai mare cantitate de resveratrol fiind determinată în vinurile roșii. Comparativ cu vinurile din alte țări, vinurile roșii românești conțin o cantitate de resveratrol peste 4,31 mg/l.

- Ulterior, s-au efectuat analize asupra probelor de lăstari de viță de vie recoltate în diferite luni ale anului care au evidențiat faptul că există o diferență semnificativă asupra conținutului de resveratrol. În majoritatea probelor colectate primăvara (mai 2020) conținutul de resveratrol era <1 mg/kg s.u. (Fetească Albă 0,51 mg/kg s.u., Muscat Ottonel 0,66 mg/kg s.u.), iar cele colectate în toamnă (noiembrie 2020) au avut un conținut de resveratrol cuprins între 261,21 mg/kg s.u. (Coarnă Neagră) – 2367,37 mg/kg s.u. (Fetească Neagră). Aceste rezultate evidențiază faptul că perioada optimă pentru recoltarea lăstarilor de viță de vie este toamna. În mod similar, s-au observat diferențe în conținutul de resveratrol al lăstarilor de viță de vie în funcție de anul de recoltare, în probele recoltate din același butaș de viță de vie conținutul de resveratrol fiind de 2,9 ori mai mare pentru soiul Fetească Albă și de 4,7 ori mai mare pentru soiul Muscat Ottonel în anul 2020 comparativ cu probele recoltate în anul 2019.

- Ca factori cu posibilă influență asupra conținutului de resveratrol s-au avut în vedere în acest studiu soiurile de viță de vie din care provin lăstarii și durata de depozitare a

lăstarilor de viță de vie post-recoltare. În acest scop au fost analizate diferite probe de lăstari provenind din soiuri de struguri albi sau roșii pentru a determina dacă tipul de soi are o influență asupra conținutului de resveratrol din plantă, nu doar în struguri și nu a fost stabilită o corelație între soi și conținutul de resveratrol. Referitor la durata de depozitare, concentrații mai mari de resveratrol au fost raportate pentru probele care au fost depozitate la temperatura mediului ambiant și păstrate 6 săptămâni față de cele prelucrate în momentul recoltării.

- Pe baza rezultatelor obținute în urma unui studiu efectuat timp de 90 de zile asupra conținutului de resveratrol din lăstarii de viță de vie în perioada de post-tăiere a probelor, s-a observat atingerea concentrației maxime de resveratrol (2712,86 mg/kg s.u.) în ziua 70, urmată de o scădere a acesteia. Astfel s-a stabilit că perioada optimă de păstrare a probelor este de 9-10 săptămâni la temperatura de aproximativ 20 °C.

- Investigațiile efectuate asupra modului de prelucrare a lăstarilor de viță de vie au evidențiat faptul că tăierea lăstarilor de viță de vie pe diferite dimensiuni înainte de depozitare nu a determinat creșterea conținutului de resveratrol ce se acumulează pe perioada depozitării.

- În timpul procesului de tăiere a viței de vie se îndepărtează o cantitate considerabilă de masă vegetală (lăstari, frunze și cărcei). Lăstarii de viță de vie conțin de până la 10 ori mai mult *trans*-resveratrol decât cărceii și de până la 40 de ori mai mult decât frunzele. Cu toate că și celelalte deșeuri de viță de vie conțin *trans*-resveratrol, extracția și purificarea acestui compus nu prezintă rentabilitate din punct de vedere economic.

- Mai multe tipuri de solvenți (metanol, etanol și acetonă cu concentrații de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 și 99,9%, metanol-HCl în raport de 99:1, metanol-HCl-apă în raport de 88:1:19 și etanol:dietil-eter în diferite rapoarte, 1:4, 1:1 și 4:1) au fost testați pentru a determina solventul care se pretează cel mai bine pentru extracția resveratrolului din lăstari de viță de vie. În același sens, s-a studiat influența raportului solid/lichid, a granulozității și a timpului de extracție. Raportul optim determinat a fost de 1:35 g/ml probă/solvent de extracție, timpul optim de extracție a fost de 4 zile și granulozitatea optimă a lăstarilor de viță de vie măcinați a fost de 500-350 μm și a dus la obținerea unei concentrații maxime de *trans*-resveratrol de 148,55 mg/kg s.u. Rezultatul obținut a fost confirmat prin optimizarea parametrilor de extracție pe baza design-ului Box-Behnken, în care răspunsul prezis a fost similar cu răspunsul obținut. Prin realizarea de extracții multiple pe aceeași probă s-a constatat că al doilea extract conținea sub 5% din cantitatea de resveratrol obținută prima oară, iar al treilea sub 1%, demonstrând că o singură extracție realizată pe același material este suficientă.

- Ca alternativă pentru utilizarea solvenților alcoolici, s-a testat extracția resveratrolului din deșeurile viticole prin tratamentul acid sau alcalin, iar rezultatele obținute au demonstrat că acesta nu este recomandat din punct de vedere economic deoarece prin utilizarea solvenților alcoolici se obțin randamente semnificativ mai mari.

- Mai multe tehnici de pre-purificare (spălare cu bicarbonat de sodiu, extracție apoasă și extracție cu benzoat de benzil) a extractelor de lăstari de viță de vie au fost testate pentru a obține un extract de resveratrol de puritate ridicată. Cea mai recomandată metodă de pre-purificare este extracția lichid-lichid cu o soluție de bicarbonat de sodiu și dietil-eter, astfel obținându-se o fracție de resveratrol cu puritatea de 78,49%. Această tehnică a dus și la îmbunătățirea turbidității extractului și schimbarea culorii din brun închis la galben deschis.

- Diferite tipuri de materiale specializate (Silicagel G60, rășini hidrofobe nefuncționalizate Amberlite XAD 2 și XAD 16 și rășină pe bază de dextran Sephadex LH-20) au fost utilizate în încercarea de a obține resveratrol de puritate înaltă. În cazul utilizării rășinii Sephadex LH-20 și a Silicagelului G60 nu s-a constatat creșterea purității probei, rezultând pierderi mari în cazul ultimului material specializat, iar prin utilizarea rășinilor

Amberlite XAD 2 și XAD 16 s-a constatat o îmbunătățire semnificativă a purității resveratrolului. Studiul comparativ realizat în continuare pe rășinile Amberlite XAD 2 și Amberlite XAD 16 a evidențiat faptul că primul tip de rășină a dus la obținerea de resveratrol de puritate ridicată. Prin purificarea extractului cu rășina Amberlite XAD 2 s-a obținut o fracție care conținea resveratrol de puritate 87,26%, cu o pierdere a resveratrolului de 29,71% față de cantitate inițială. Comparativ, în urma purificării extractului prin coloana cu rășină Amberlite XAD 16 s-a obținut o fracție care conținea resveratrol de puritate 79,55%, cu o pierdere a resveratrolului de 47,53% față de cantitate inițială.

- În vederea determinării eficienței adsorbției resveratrolului de către granulele de rășină, același extract a fost trecut de trei ori prin coloane cu rășină Amberlite XAD 2. A doua fracție a conținut 0,38% resveratrol raportat la prima purificare, iar a treia fracție a conținut 0,005% resveratrol raportat la prima purificare și astfel s-a stabilit faptul că adsorbția resveratrolului se realizează eficient la prima trecere prin coloana cu rășină Amberlite XAD 2 și nu se înregistrează pierderi semnificative. Astfel, s-a demonstrat că o singură trecere prin coloană este suficientă pentru purificarea extractului.

- Un alt aspect al purificării avut în vedere în studiul de față este reprezentat de determinarea cantității optime de extract la care se poate obține o fracție cât mai pură utilizând ca material de coloană Amberlite XAD 2. Determinările efectuate au arătat că la purificarea a 50 ml extract s-a obținut o fracție cu puritatea de 89,49%, iar puritatea fracțiilor a scăzut odată cu creșterea cantității de extract, însă influența nu a fost una semnificativă.

Diseminarea rezultatelor cercetărilor

Rezultatele cercetărilor experimentale efectuate în cadrul obiectivelor stabilite pentru teza de doctorat au fost valorificate prin publicarea a 2 articole științifice în reviste de specialitate internaționale și a 3 articole în reviste în domeniul tezei din țară, recunoscute CNCSIS.

A. Articole publicate în reviste indexate ISI Web of Knowledge

1. **Crăciun, A. L., Gutt, G.** (2022). Study on kinetics of trans-resveratrol, total phenolic content, and antioxidant activity increase in vine waste during post-pruning storage. *Applied Sciences*, 12(3), 1450; DOI: <https://doi.org/10.3390/app12031450> (factor de impact 2.838) <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/3/1450> – **articol Q2**
2. **Crăciun, A. L., Gutt, G.** (2023). Optimization of experimental parameters in the solvent extraction of *trans*-resveratrol from Pruning Waste of *Vitis vinifera*, Fetească Neagră variety. *Applied Sciences*, 13(2), 823, DOI: <https://doi.org/10.3390/app13020823> (factor de impact 2.838) <https://www.mdpi.com/2076-3417/13/2/823> – **articol Q2**

B. Articole publicate în reviste indexate în Baze de Date Internaționale (BDI)

1. **Crăciun, A. L., Gutt G.** (2021). A rapid method of determination of trans-resveratrol in romanian commercial wines by reversed-phase HPLC. *Food and Environment Safety Journal*, 19(4), <http://fia-old.usv.ro/fiajournal/index.php/FENS/article/view/755>
2. **Crăciun, A. L., Gutt G.** (2021). Study on extraction and purification of *trans*-resveratrol from vine waste – A review. *Food and Environment Safety Journal*, 20(2). <http://fia-old.usv.ro/fiajournal/index.php/FENS/article/view/793>
3. **Crăciun, A. L., Gutt G.** (2022). Potential of romanian vine wastes as a natural resource of *trans*-resveratrol. *Food and Environment Safety Journal*, 20(4). <http://fens.usv.ro/index.php/FENS/article/view/851>

C. Lucrări comunicate la manifestări științifice internaționale

1. **Crăciun, A. L., Gutt G.** Study on kinetics of *trans*-resveratrol, total phenolic content, and antioxidant activity increase in vine waste during post – pruning storage. The 8th International Conference of Biotechnologies, Present and Perspectives, Facultatea de Inginerie Alimentară, Universitatea „Ștefan cel Mare” din Suceava (România), 5 noiembrie, 2021.
2. **Crăciun, A. L., Gutt G.** *Trans*-resveratrol increase in vine-shoots wastes of Muscat Ottonel variety during 7 weeks post-harvest. The 88 International Scientific Conference of Young Scientists and Students „Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution”, Universitatea Națională de Tehnologii Alimentare din Kiev (Ucraina), aprilie-mai, 2022.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- [Aa,'03] Aaviksaar, A., Haga, M., Pussa, T., Roasto, M., & Tsoupras, G. (2003). Purification of resveratrol from vine stems. *Proceedings – Estonian Academy of Sciences Chemistry*, 52(4), pp. 155–164.
- [Al,'14a] Al-Jumaily, E. F., Hamid, G. S., & Ali, K. F. (2014). Synthesis and total phenol content of new resveratrol derivative. *American Journal of Advanced Drug Delivery*, 2(3), 320–329.
- [Am,'12] Amri, A., Chaumeil, J. C., Sfar, S., & Charrueau, C. (2012). Administration of resveratrol: what formulation solutions to bioavailability limitations? *Journal of Controlled Release*, 158(2), 182–193.
- [An,'12] Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A.-L., & Haroutounian, S. A. (2012). Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their *in vitro* antioxidant properties. *LWT – Food Science and Technology*, 48, 316–322.
- and wine. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(13), 1366–1381.
- [Ba,'14] Barros, A., Gironés-Vilaplana, A., Teixeira, A., Collado-González, J., Moreno, D. A., Gil-Izquierdo, A., Rosa, E., & Domínguez-Perles, R. (2014). Evaluation of grape (*Vitis vinifera* L.) stems from Portuguese varieties as a resource of (poly) phenolic compounds: A comparative study. *Journal of Food Research International*, 65, 375–384.
- [Be,'14] Berchová-Bimová, K., Soltysiak, J., & Vach, M. (2014). Role of different taxa and cytotypes in heavy metals absorption in knotweeds (*Fallopia*). *Scientia Agricola*, 45, 11–18.
- [Bo,'01] Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161(5), 839–851.
- [Bi,'18] Billet, K., Houillé, B., Besseau, S., Mélin, C., Oudin, A., Papon, N., & Lanoue, A. (2018). Mechanical stress rapidly induces E-resveratrol and E-piceatannol biosynthesis in grape canes stored as a freshly-pruned byproduct. *Food Chemistry*, 240, 1022–1027.
- [Br,'08] Bravo, M. N., Feliciano, R., Silva, S., Coelho, A. V., Vilas Boas, L., & Bronze M. R. (2008). Analysis of *trans*-resveratrol: Comparison of methods and contents in Muscatel fortified wines from Setúbal region in Portugal. *Journal of food Composition and Analysis*, 21, 634–643.
- [Ce,'17] Cebrián, C., Sánchez-Gómez, R., Salinas, M. R., Alonso, G. L., & Zalacain, A. (2017). Effect of post-pruning vine-shoots storage on the evolution of high-value compounds, *Industrial Crops and Products*, 109, 730–736.
- [Ch,'03] Chung, I. M., Park, M. R., Chun, J. C., & Yun, S. J. (2003). Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. *Plant Science*, 164(1), 103–109.
- [Cr,'21b] Crăciun, A. L., & Gheorghe, G. (2021). A rapid method of determination of *trans*-resveratrol in romanian commercial wines by reversed-phase HPLC. *Food and Environment Safety Journal*, 19(4).
- [Cr,'22a] Crăciun, A. L., & Gutt, G. (2022). Study on kinetics of *trans*-resveratrol, total phenolic content, and antioxidant activity increase in vine waste during post-pruning storage. *Applied Sciences*, 12(3), 1450.
- [Cr,'22b] Crăciun, A. L., & Gheorghe, G. (2022). Potential of romanian vine wastes as a natural resource of *trans*-resveratrol. *Food and Environment Safety Journal*, 20(4).
- [Cr,'23] Crăciun, A. L., & Gutt, G. (2023). Optimization of Experimental Parameters in the Solvent Extraction of *Trans*-Resveratrol from Pruning Waste of *Vitis vinifera*, Fetească Neagră Variety. *Applied Sciences*, 13(2), 823.

- [Cv,'10] Cvejic, J. M., Djekic, V. S., Petrovic, V., Atanackovic, T. M., Jovic, M. S., Brceski, I. D., & Bukarica, C. G. (2010). Determination of *trans*- and *cis*-resveratrol in Serbian commercial wines. *Journal of Chromatographic Science*, *48*, 229–234.
- [Ew,'17] Ewald, P., Delker, U., & Winterhalter, P. (2017). Quantification of stilbenoids in grapevine canes and grape cluster stems with a focus on long-term storage effects on stilbenoid concentration in grapevine canes. *Food Research International*, *100*, 326–331.
- [Fa,'16] Farhadi, K., Esmailzadeh, F., Hatami, M., Forough, M., & Molaie, R. (2016). Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province. *Food Chemistry*, *199*, 847–855.
- [Fa,'18b] Fabjanowicz, M., Bistrzanowska, M., Namieśnik, J., Tobiszewski M., & Plotka-Wasyłka, J. (2018). An analytical hierarchy process for selection of optimal procedure for resveratrol determination in wine samples. *Microchemical Journal*, *142*, 126–134.
- [Ga,'15] Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Gruesso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., ... & Borrás, C. (2015). Properties of resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 837042.
- [Ga,'16] Garcia, L., Garcia, R., Pochecha, G., Sutuli, F., De Souza, F., Mansur, E., & Leal, I. (2016). Optimized extraction of resveratrol from *Arachis repens* handro by ultrasound and microwave: A correlation study with the antioxidant properties and phenol contents. *The Scientific World Journal*, 5890897.
- [Go,'14] Gorena, T., Saez, V., Mardones, C., Vergara, C., Winterhalter, P., & Von Baer, D. (2014). Influence of post-pruning storage on stilbenoid levels in *Vitis vinifera* L. Canes. *Food Chemistry*, *155*, 256–263.
- [Gu,'16] Guerrero, R. F., Biais, B., Richard, T., Puertas, B., Waffo-Teguo, P., Merillon, J. M., & Cantos-Villar, E. (2016). Grapevine cane's waste is a source of bioactive stilbenes. *Industrial Crops and Products*, *94*, 884–892.
- [He,'12b] He, Y. Z., Wang, B., Zhuang, Y., & Lu, Y. P. (2012). Study on separation and purification of resveratrol in wine grape residue with aqueous two phase extraction method. In *Advanced Materials Research*, *550*, 1743–1746. Trans Tech Publications Ltd.
- [Ho,'15b] Houillé, B., Besseau, S., Courdavault, V., Oudin, A., Glévarec, G., Delanoue, G., Guérin, L., Simkin, A. J., Papon, N., Clastre, M., Giglioli-Guivarc'h, N., & Lanoue, A. (2015). Biosynthetic origin of resveratrol accumulation in grape canes during postharvest storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 1631–1638.
- [Je,'95] Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., Meunier, P., & Trollat, P. (1995). Resveratrol content of wines of different ages: Relationship with fungal disease pressure in the vineyard. *American Journal of Enology and Viticulture*, *46*, 1–4.
- [Je,'19] Jesus, M. S., Genisheva, Z., Romani, A., Pereira, R. N., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2019). Bioactive compounds recovery optimization from vine pruning residues using conventional heating and microwave-assisted extraction methods. *Industrial Crops and Products*, *132*, 99–110.
- [Ju,'16] Ju, Y., Zhang, A., Fang, Y., Liu, M., Zhao, X., Wang, H., & Zhang, Z. (2016). Phenolic compounds and antioxidant activities of grape canes extracts from vineyards. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *14*, 18.
- [Ka,'10] Karacabey, E., & Mazza, G. (2010). Optimisation of antioxidant activity of vine waste extracts using response surface methodology. *Food Chemistry*, *119*, 343–348.

- [Ku,'13] Kuo, C. H., Chen, B. Y., Liu, Y. C., Chang, C. M. J., Deng, T. S., Chen, J. H., & Shieh, C. J. (2013). Optimized ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Polygonum cuspidatum*. *Molecules*, *19*(1), 67–77.
- [Li,'13b] Liu, C., Wang, L., Wang, J., Wu, B., Liu, W., Fan, P., ... & Li, S. (2013). Resveratrols in *Vitis* berry skins and leaves: Their extraction and analysis by HPLC. *Food Chemistry*, *136*(2), 643–649.
- [Li,'15] Liu, F., Antoniou, J., Yue, L. Y. J., Yokoyama, W., Ma, J., & Zhong, F. (2015). Preparation of gelatin films incorporated with tea polyphenol nanoparticles for enhancing controlled-release antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*, 3987–3995.
- [Ma,'12a] Mantegna, S., Binello, A., Boffa, L., Giorgis, M., Cena, C., & Cravotto, G. (2012). A one-pot ultrasound-assisted water extraction/cyclodextrin encapsulation of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *Food Chemistry*, *130*(3), 746–750.
- [Mc,'94] McMurtrey, K. D., Minn, J., Pobanz, K., & Shultz, T. P. (1994). Analysis of wines for resveratrol using direct injection high-pressure liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *42*, 2077–2080.
- [Mo,'17] Moretón-Lamas, E., Lago-Crespo, M., Lage-Yusty, M. A., & López-Hernández, J. (2017). Comparison of methods for analysis of resveratrol in dietary vegetable supplements. *Food Chemistry*, *224*, 219–223.
- [Mo,'18] Moreira, M. M., Barroso, M. F., Porto, J. V., Ramalhosa, M. J., Švarc-Gajić, J., Estevinho, L., & Delerue-Matos, C. (2018). Potential of Portuguese vine shoot wastes as natural resources of bioactive compounds. *Science of the Total Environment*, *634*, 831–842.
- [No,'63] Nonomura, S., Kanagawa, H., & Makimoto, A. (1963). Chemical constituents of polygonaceous plants. I. Studies on the components of ko-j o-kon. (*Polygonum cuspidatum* sieb. et zucc.). *Yakugaku Zasshi*, *83*, 988.
- [Ol,'01] O'Loughlin, J. L. (2001). Alcohol and cardiovascular diseases-DJ Chadwick and JA Goode (Eds.), Wiley, New York, 1998, 272pp, Social Science & Medicine, *11*(52), 1757.
- [Pa,'13] Pawlus, A. D., Sahli, R., Bisson, J., Rivière, C., Delaunay, J. C., Richard, T., ... & Mérillon, J. M. (2013). Stilbenoid profiles of canes from *Vitis* and *Muscadinia* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(3), 501–511.
- [Pa,'18] Pajović-Šćepanović, R., Wendelin, S., & Eder, R. (2018). Phenolic composition and varietal discrimination of Montenegrin red wines (*Vitis vinifera* var. Vranac, Kratošija, and Cabernet Sauvignon). *European Food Research and Technology*, *244*(12), 2243–2254.
- [Pi,'16] Piñeiro, Z., Marrufo-Curtido, A., Serrano, M. J., & Palma, M. (2016). Ultrasound-assisted extraction of stilbenes from grape canes. *Molecules*, *21*(6), 784.
- [Pi,'17a] Piñeiro, Z., Marrufo-Curtido, A., Vela, C., & Palma, M. (2017). Microwave-assisted extraction of stilbenes from woody vine material. *Food and Bioprocess Technology*, *103*, 18–26.
- [Pi,'18a] Piyaratne, S. P. (2018). Extraction and purification of (E)-Resveratrol from the Bark of Maine's Native Spruces. Doctoral thesis, University of Maine, Sri Lanka.
- [Ra,'04] Ratola, N., Faria, J. L., & Alves, A. (2004). Analysis and quantification of *trans*-resveratrol in wines from Alemtejo Region (Portugal). *Food Technology and Biotechnology*, *42*(2), 125–130.
- [Ra,'08] Rayne, S., Karacabey, E., & Mazza, G. (2008). Grape cane waste as a source of *trans*-resveratrol and *trans*-viniferin: High-value phytochemicals with medicinal and anti-phytopathogenic applications. *Industrial Crops and Products*, *27*, 335–340.

- [Ra,'15b] Rajha, H. N., Chacar, S., Afif, C., Vorobiev, E., Louka, N., & Maroun, R. G. (2015). β -Cyclodextrin-assisted extraction of polyphenols from vine shoot cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 3387–3393.
- [Ri,'81] Richard, J. L., Cambien, F., & Ducimetière, P. (1981). Epidemiologic characteristics of coronary disease in France, *Nouv. Press. Med.*
- [Ro,'01] Romero-Pérez, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., Andrés-Lacueva, C., & de la Torre-Boronat, M. C. (2001). Method for the quantitative extraction of resveratrol and *piceid* isomers in grape berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 210–215.
- [Ru,'15] Ruiz-Moreno, M. J., Raposo, R., Cayuela, J. M., Zafrilla, P., Pineiro, Z., Moreno-Rojas, J. M., Mulero, J., Puertas, B., Giron, F., Guerrero, R. F., & Cantos-Villar, E. (2015). Valorization of grape stems. *Industrial Crops and Products*, 63, 152–157.
- [Sa,'13] Saputra, M. A., Sirat, H. M., & Aminah, N. S. (2013). Stilbenoids from *Vitis labrusca* “Isabella” stems. *Chemistry of Natural Compounds*, 49, 924–926.
- [Si,'92] Siemann, E. H., & Creasy, L. L. (1992). Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43, 49–52.
- [So,'93] Sotheeswaran, S., & Pasupathy, V. (1993). Distribution of resveratrol oligomers in plants. *Phytochemistry*, 32(5), 1083–1092.
- [So,'01] Souto, A., Carneiro, M., Seferin, M., Senna, M., Conz, A., & Gobbi, K. (2001). Determination of *trans*-resveratrol concentrations in Brazilian red wines by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 441–445.
- [So,'15] Soral, I., Vrchtová, N., Triska, J., Balík, J., Horník, Š., Cuřínová, P., & Sýkora, J. (2015). Various extraction methods for obtaining stilbenes from grape cane of *Vitis vinifera* L. *Molecules*, 20(4), 6093–6112.
- [Sr,'07] Srinivas, G., Babykutty, S., Sathiadevan, P. P., & Srinivas P. (2007). Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent. *Medicinal Research Reviews*, 27(5), 591–608.
- [Su,'21] Sun, B., Zheng, Y. L., Yang, S. K., Zhang, J. R., Cheng, X. Y., Ghiladi, R., ... & Deng, W. W. (2021). One-pot method based on deep eutectic solvent for extraction and conversion of polydatin to resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *Food Chemistry*, 343, 128498.
- [Va,'00] Vastano, B. C., Chen, Y., Zhu, N., Ho, C., Zhou, Z., & Rosen, R. T. (2000). Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 253–256.
- [Va,'12] Vannozzi, A., Dry, I. B., Fasoli, M., Zenoni, S., & Lucchin, M. (2012). Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multigenic family: Genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses. *BMC Plant Biology*, 12, 1–22.
- [Wa,'21] Wang, J. D., Fu, L. N., Wang, L. T., Cai, Z. H., Wang, Y. Q., Yang, Q., & Fu, Y. J. (2021). Simultaneous transformation and extraction of resveratrol from *Polygonum cuspidatum* using acidic natural deep eutectic solvent. *Industrial Crops and Products*, 173, 114140.
- [We,'14] Wei, Y., Li, P., Ma, L., & Li, J. (2014). Separation and purification of four stilbenes from *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon roots through high-speed counter-current chromatography. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 35, 226–233.
- [*] <http://oiv.int/public/medias/6782/oiv-2019-statistical-report-on-world-vitiviniculture.pdf> - International Organisation of Vine and Wine Intergovernmental Organisation, 2019 Statistical Report on World Vitiviniculture, accesat la 14.08.2020