

Valorificarea reziduurilor industriei viticole prin nutriția animal îmbogățită în
antioxidanți
(Valorization of wine industry waste as a source of antioxidants for an enriched animal
diet)

Raport științific sintetic 2013-2016

Obiectiv 1.1 Obținerea extractului din tescovină (ET), evaluarea compoziției în
polifenoli și a activității antioxidante

Activitate 1.1.1 Obținerea extractului din tescovină (ET) și determinarea conținutului în
polifenoli totali

Reziduul de la fermentarea vinului roșu folosit provine de la podgoria Valea
Calugareasca. Tescovina uscată a fost obținută de la firma Dionis Agrifood prin
bunavoința domnului Manager General Stroie Constantin. Tescovina a fost apoi
macinată în vederea extracției. După extracția cu apă fierbinte **polifenolii totali (TP)** au
fost determinați prin metoda Folin-Ciocalteu.

Rezultatele au fost exprimate în mg gallic acids equivalents (GAE)/L iar pentru
extractul ET cantitatea de polifenoli totali a fost de **422.91±13.27 mg GAE/L extract
ET**

Activitate 1.1.2 Analiza prin spectroscopie UV-Vis și cromatografie de înalt
performanță cuplată cu spectroscopia de masă (LC-MS) a compoziției în polifenoli a ET

Spectrul extractului apos de tescovina (**ET**) prezintă un maxim de absorbție la $\lambda = 270$
nm. Aceasta indică prezența compusilor de tip **flavan-3-oli, catechine și procianidine**.

Pentru analiza LC-DAD-MS 500 µl ETau fost filtrati printr-un filtru SPARTAN 13, 0.45 µm (Whatman) inainte de separarea cromatografica.

Analiza s-a facut in modul "electrospray positive ion" (ESI+)pe un spectrometru de masa AQA (Thermoquest/ Finnigan), cuplat la o pompa P4000LC (Finnigan) si un detector UV6000LP diode array detector (Finnigan). Separarea a fost realizata pe o coloana M-1021290001 Chromolith performance RP-18ET.

In functie de spectrele UV-Vis si de masa s-au identificat in compozitia extractului ET **derivati ai acizilor fenolici, protocatecuic,cafeic, galic si vanilic**. Acesti derivati ai acizilor fenolici sunt formati cu una dintre **procianidinele B** (care este **dimer de epicatechina**).Au mai fost identificate **catechina si epicatechina** unele dintre componentele importante ale acestui extract.

Activitate 1.1.3 Determinarea activitatii antioxidantea ET: testele FRAP i DPPH, inhibi ia lipoxygenazei-1 pure din soia

Determinarea activitatii antioxidante totale ca putere de reducere a fierului- testul FRAP

Valoarea **FRAP** a extractului TE este de **13,85±1,47**.

Determinarea activitatii antioxidante antiradicalice prin testul DPPH

Activitatea antiradicalica a extractului se masoara in echivalenti Trolox, si se calculeaza dupa oecuatie obtinuta de pe o curba de calibrare.

Activitatea antiradicalica s-a calculat pentru 5 concentratii: 0,42 mg GAE/ml extract, 0,28 mg GAE/ml extract, 0,21 mg GAE/ml extract, 0,14 mg GAE/ml extract, 0,007 mg

GAE/ml extract. Prin reprezentare grafică a activității antiradicalice în funcție de concentrație s-a calculat EC_{50} ca fiind **1.56 mg GAE/ml extract**.

Determinarea inhibiției lipoxigenazei-1 pure din soia (sLOX) în prezența extractului ET

Cinetica reacției lipoxigenazei și determinarea inhibiției sLOX în prezența extractului ET

Activitatea enzimatică a fost măsurată cu un spectrofotometru Specord 250 (Analytic Jena) la 234 nm și 25°C. Activitatea sLOX se determină prin creșterea în absorbanta la 234- prin formarea produsilor de reacție-după adăugarea acidului linoleic în tampon borat împreună cu enzima.

Nu s-a observat inhibiția lipoxigenazei de către extractul ET.

Prin realizarea integrală a obiectivului proiectului pentru anul 2013 s-a obținut extractul de tescovina TE care a fost analizat prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC) cuplată cu spectroscopia de masă (MS). S-a evidențiat astfel faptul că ET conține oligomeri formați din acizi fenolici și procianidina B (dimer de epicatechina). ET prezintă activitate antioxidantă antiradicalică și de reducere a fierului dar nu are activitate antilipoxigenazică.

Etapa unica 2014

Obiectiv 1. Evaluarea prin studii experimentale *in vitro* si *in vivo* a efectului ET la porc

Activitate 1.1. Efectuarea tratamentelor cu ET pe culturi de celule intestinale de porc (IPEC-1):-evaluarea spectrofotometric a polifenolilor din mediul de cultur dupa tratamentul cu ET a celulelor si evaluarea spectrofotometric a polifenolilor din matricea intracelulara dupa tratamentul cu ET

Celulele IPEC-1, o linie de celule epiteliale intestinale, au fost cultivate la o densitate de 2×10^5 celule/ml si lasate 24 de ore pentru a adera. Au fost apoi tratate cu extract apos de tescovina (ET) la concentratii de 250 ng/ml, 500 ng/ml si 1000 ng/ml. Concentratiile acestea au fost alese dupa efectuarea testului MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] de citotoxicitate, astfel incat concentratiile folosite sa nu fie toxice si letale pentru celule. Tratamentul cu cele trei concentratii mentionate a durat 3 ore-perioada scurta de incubare si 24 de ore-perioada lunga de incubare.

In matricea intracelulara dupa 24 de ore de coincubare a celulelor IPEC cu ET la doza cea mai mare administrata (1000 ng/ml), se inregistreaza cea mai buna absorbtie a polifenolilor din extract. Maximul de absorbtie, λ_{max} , in acest caz a fost de 287.1 nm, mai mare decat cel al extractului ET. Spectrul extractului apos de tescovina (**ET**) prezinta un maxim de absorbtie la $\lambda_{max} = 270$ nm. Aceasta crestere batocromica arata o usoara oxidare a moleculelor in celule.

Interesant este ca la doza cea mai mica administrata, in mediul extracelular s-a observat o intensa absorbtie la $\lambda_{max} = 295.6$ nm. Am putea motiva acest rezultat prin posibilele

reactii de oxidare dintre polifenolii continuti in ET si componentele mediului extracelular (proteine, alti antioxidanti). Ca o observatie generala in cazul tuturor masuratorilor se constata oxidarea polifenolilor din ET atat in mediul extracelular cat si in celule. Aceasta oxidare da maxime de absorbtie la valori incepand cu $\lambda_{max} = 276$ nm si sfarsind cu $\lambda_{max} = 627.0$. Aceasta extinsa modulare a oxidarii poate fi motivata prin reactii inter si intramoleculare determinate de potentialul oxidativ al polifenolilor. Pentru λ_{max} cu valori intre 393.3 si 487.5 au fost indentificati compusii de oxidare *o*-quinone.

Activitate 1.2. Efectuarea experimentului 1 *in vivo* pe purcei în rca i (10-30 kg)

In cadrul experimentului *in vivo*, desi activitatile proiectului prevad doar studiul tescovinei integrale din care s-a obtinut si analizat extractul ET, s-au folosit doua tipuri de tescovina cu (GPS+) si fara samburi (GPS-) incorporate in doua diete (D1/GPS+ si D2/GPS-). Procentul in care tescovina a fost data in dieta purceilor a fost de 3%.

18 purcei hibridi au fost impartiti in 3 grupuri experimentale (6 purcei/grup), fiecare grup primind o alimentatie diferita in ceea ce priveste continutul de tescovina. Astfel grupul control (C) a fost hranit cu o dieta uzuala pentru purcei intarcati, al doilea grup (D1/GPS+) cu o dieta continand 3% tescovina integrala si al treilea grup (D2/GPS-) dieta cu tescovina fara samburi, timp de 42 de zile. La sfarsitul acestei perioade au fost colectate probe de sange, iar dupa sacrificarea purceilor, probe de organe. Toate aceste probe au fost pastrate la -80°C pentru analize viitoare.

Activitate 1.3. Determinarea parametrilor biochimici si imunologici

Determinarea parametrilor biochimici.

Parametrii biochimici au fost determinati folosind analizorul automat BS-130 Chemistry analyser si rezultatele au fost procesate in concordanta cu instructiunile producatorului.

Parametrii biochimici determinati au fost: glucoza, colesterolul total, trigliceridele, fosforul, calciul, magneziul, fierul, proteina totala, albumina, bilirubina, urea, creatinine, fosfataza alcalina (ALKP), aspartate aminotransferaza (TGO/AST), alanine transaminaza (TGP/ALT), gama-glutamyl transpeptidaza (GGT) si lactat dehidrogenaza (LDH).

Analiza statistica. Rezultatele finale au fost analizate si comparate folosind programul Stat View 5.0, ANOVA (one-way analysis of variance) urmat de testul Fisher PSLD. Valorile lui *p* mai mici decat 0.05 au fost considerate semnificative din punct de vedere statistic.

In urma analizarii rezultatelor parametrilor biochimici putem spune ca dieta suplimentata cu 3% tescovina nu determina inrautatirea starii de sanatate a purceilor. In principiu valorile diversilor parametri s-au mentinut in limite normale; in cazul glucozei, calciului si magneziului s-a observat o crestere semnificativa din punct de vedere statistic in raport cu lotul control.

Determinarea parametrilor imunologici. Determinarea concentratiilor subclaselor de imunoglobuline (IgG, IgA, IgM)

Concentratia totala a subclaselor de imunoglobuline a fost masurata prin ELISA (Bethyl). Serurile au fost diluate 1/80000, 1/4000 and 1/8000 in tampon Tris salin pentru detectarea IgG, IgA si respectiv IgM, respectand recomandarile producatorilor. Dilutii ale unor seruri cu concentratii cunoscute au fost utilizate ca standarde si rezultatele au fost exprimate ca mg de subclasa de imunoglobulina /mL.

Dieta imbogatita cu tescovina 3% a modulat raspunsul imun umoral. In cazul tescovinei

fara samburi (D2) s-a observat cresterea sintezei imunoglobulinelor nespecifice M si G (IgM, IgG) cu rol important in generarea imunitatii innascute si dobandite. Scaderea sintezei acestor doua tipuri de molecule s-a observat in cazul dietei continand tescovina integrala. Ambele diete induc cresterea sintezei de IgA in raport cu dieta control. IgA joaca un rol important in lupta impotriva bacteriilor in mucoase (caile respiratorii, de exemplu).

Prin realizarea integrala a obiectivului si activitatilor propuse pentru anul 2014 s-a demonstrat ca polifenolii din extractul de tescovina sunt absorbiti de celule in forma oxidata. Oxidarea acestor compusi, mediata de *o*-quinone, a fost observata atat in mediul extracelular cat si in matricea intracelulara.

Experimentul *in vivo* pe purcei intarcati care au primit o dieta imbogatita cu 3% tescovina indica faptul ca acest reziduu poate fi incorporat in hrana purceilor, analizele biochimice si imunologice dovedind ca starea de sanatate a animalelor este buna, la fel ca in cazul lotului control hranit cu dieta clasica.

Etapa unica 2015

Obiectiv 1. Evaluarea prin studii experimentale *in vivo* a efectului ET la porc

Activitate 1.1. Analiza absorbției polifenolilor la nivelul organelor interne la porc recoltate în cadrul experimentului 1

După prelevare probele de organe au fost păstrate la -80°C iar apoi, încă înghețate, macinate în azot lichid. Pulberea astfel obținută a fost păstrată în continuare la -80°C până la extracție. Pentru evaluarea absorbției polifenolilor la nivelul organelor s-a făcut o extracție în metanol (1g țesut la 10 ml de metanol) a pulberii obținute prin macinare. După extracția prin sonicare de 1 oră probele au fost centrifugate iar supernatantul colectat în tuburi Eppendorf de 1,5 ml. Tuburile conținând extractele au fost păstrate la -20°C până la determinarea spectrelor.

Prin spectroscopie UV-Vis au fost determinate spectre pentru fiecare organ recoltat (creier, inimă, duoden, colon, ficat, rinichi, ganglioni mezenterici, splină) și mușchi *Longissimus dorsi*, în total peste 200. După măsurarea spectrelor, din programul aparatului pentru prelucrarea spectrelor s-a folosit funcția „Substraction”, când din varianta experimentală s-a scăzut varianta control, și funcția „Overlay” pentru suprapunerea amprentelor spectrale rezultate din scadea precedentă.

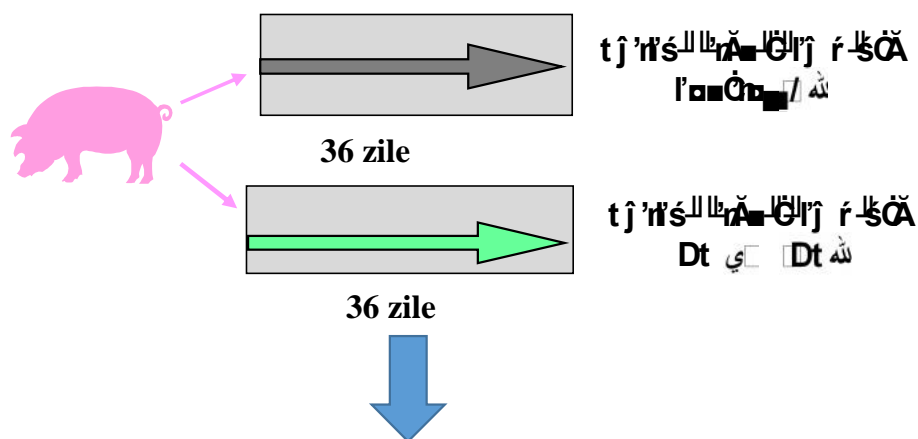
Activitate 1.2. Efectuarea experimentului 2 *in vivo* pe porci în vârstă (10-30 kg):

-administrarea *in vivo* a ET

-recoltare de probe

În cadrul experimentului 2 *in vivo*, s-a incorporat în proporție de 5% în nutrețul uzual folosit pentru hrana porcelor întarșiți, țescovina uscată. 20 porci hibrizi au fost împărțiți în 2 grupuri experimentale (10 porci/grup), fiecare grup primind o alimentație diferită în

cea ce privește conținutul de tescovina. Astfel grupul control (C) a fost hrănit cu o dietă uzuală pentru porci înțărcați și al doilea grup (D/GP) cu o dietă conținând 5% tescovina integrală timp de 30 de zile. La sfârșitul acestei perioade au fost colectate probe de sânge, iar după sacrificarea porcilor, probe de organe (creier, inimă, duoden, colon, ficat, rinichi, ganglioni mezenterici, splină) și mușchi *Longissimus dorsi*. Toate aceste probe au fost păstrate la -80°C pentru analize viitoare. Schema planului experimental pentru experimentul 2 *in vivo* pe porci înțărcați este prezentată mai jos.



Probe de organe au fost prelevate de la ambele grupuri experimentale, macinate în azot lichid și păstrate la -80°C pentru analize viitoare

Schema planului experimental pentru experimentul 2 *in vivo* pe porci înțărcați

Activitate 1.3. Analiza oxidării polifenolilor la nivelul organelor interne la porc

Analiza oxidării polifenolilor la nivelul organelor interne la porc s-a făcut ca în cazul analizei absorbției acestora (Activitatea 1.1/ 2015) prin analiza spectroscopică UV-Vis. Prepararea extractelor, determinarea spectrelor și prelucrarea lor a fost făcută ca mai sus

(Activitatea 1.1/ 2015).

Lungimile de unda la care s-au inregistrat maxime de absorbtie pentru toate organele analizate indica faptul ca polifenolii au fost metabolizati si astfel au fost absorbiti la nivelul organelor interne a purceilor - max intre 274,9 si 298 nm. Spectrul extractului apos de tescovina (ET) prezinta un maxim de absorbtie la $\lambda = 270$ nm. Aceasta crestere batocromica arata o usoare oxidare a moleculelor de polifenoli dupa ingerare. In termeni de oxidare maximele cuprinse intre 315 si 588 pot fi justificate printr-o extinsa modulare a oxidarii prin reactii inter (proteine, alti antioxidanti) si intramoleculare determinate de potentialul oxidativ al polifenolilor

Prin realizarea integrala a obiectivului si activitatilor propuse pentru anul 2015 s-a demonstrat ca polifenolii din hrana purceilor in care a fost inclusa tescovina in proportii de 3% si 5% sunt metabolizati si apoi absorbiti la nivelul organelor studiate (creier, inima, duoden, colon, ficat, rinichi, ganglioni mezenterici, splina) si muschiului *Longissimus dorsi* in forma oxidata.

Etapa unica 2016

Obiectiv 1.

Corelarea parametrilor determina i *in vitro* cu cei obtinu i *in vivo* privind absorbtia i oxidarea polifenolilor din ET.

Activitate 1.1.

Analiza i corelarea rezultatelor *in vitro* i *in vivo*

Prin realizarea integrala a obiectivului si activitatii propuse pentru anul 2016 prin determinarea amprentelor spectrale UV-Vis, s-a aratat ca celulele epiteliale intestinale IPEC-1 pot constitui un model *in vitro* pentru absorbtia calitativa a polifenolilor in duoden, ganglioni mezenterici, splina si rinichi la porc. Deoarece din punct de vedere a digestiei si a absorbtiei nutrientilor, porcul constituie un model si pentru nutritia umana putem extrapola rezultatul de mai sus si la nivel de digestie si absorbtie intestinala a polifenolilor la om. Aceasta concluzie este importanta pentru a demonstra corelatia ce exista intre modelul *in vitro* si cel *in vivo* studiat in ceea ce priveste absorbtia calitativa din hrana ingerata a polifenolilor la nivel celular si tisular. Astfel pot fi reduse in acest caz, costurile si timpul efectuarii experimentelor *in vivo* pe porc prin folosirea metodei *in vitro* de testare pe celulele epiteliale intestinale IPEC-1.