
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Cercetări privind activitatea antioxidantă a compușilor fenolici din vinurile românești

Doctorand **Roxana Banc**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Felicia Loghin**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Considerații generale privind compușii fenolici antioxidanți din compoziția vinurilor	19
1.1. Aspecte generale privind compoziția fenolică a vinurilor	19
1.2. Compuși fenolici prezenți în vinuri: clasificare, structură	20
1.2.1. Acizii fenolici	20
1.2.1.1. Acizii hidroxibenzoici	21
1.2.1.2. Acizii hidroxicinamici	21
1.2.2. Flavonoidele	21
1.2.2.1. Flavonele	22
1.2.2.2. Flavanonele	23
1.2.2.3. Flavonolii	23
1.2.2.4. Flavononolii	23
1.2.2.5. Flavanii	24
1.2.2.6. Flavan-3-olii	24
1.2.2.7. Calcone și dihidrocalcone	24
1.2.2.8. Pigmenții antocianici	24
1.2.3. Taninurile	26
1.2.3.1. Taninurile hidrolizabile	26
1.2.3.2. Taninurile condensate	26
1.2.4. Stilbenii	27
1.2.5. Cumarinele	28
1.2.6. Derivații feniletanolici	28
1.2.7. Lignanii și neolignanii	28
2. Tehnici și metode de analiză folosite în studiul compușilor fenolici din vinuri	29
2.1. Extracția compușilor fenolici din struguri și din vin	29
2.1.1. Extracția fenolilor din struguri în vin: metode predictive	29
2.2. Analiza vinurilor: cuantificarea și separarea polifenolilor	30
2.2.1. Metode spectrofotometrice utilizate în cuantificarea claselor fenolice și a fenolilor totali	30
2.2.2. Tehnici cromatografice utilizate în separarea, analiza calitativă și cantitativă a compușilor fenolici	31
2.2.2.1. Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC)	31
2.2.2.2. Cromatografia de lichide de ultra-înaltă performanță (UPLC)	32
2.2.2.3. Cromatografia de gaze (GC)	32
2.3. Alte metode de separare și cuantificare a polifenolilor	33
2.3.1. Electroforeza capilară (CE)	33
2.4. Metode spectrale utilizate în elucidarea structurii și caracterizarea compușilor fenolici	33
2.4.1. Spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (RMN)	33
2.4.2. Spectroscopia în infraroșu (IR)	33
2.5. Metode de evaluare a activității antioxidante a vinurilor	34

3. Efectele compușilor fenolici din vin asupra sănătății umane	35
3.1. Beneficiile consumului moderat de vin asupra sănătății	35
3.2. Biodisponibilitatea compușilor fenolici	36
3.3. Acizii fenolici din vin și efectele acestora asupra sănătății	37
3.4. Flavonoidele din vin și efectele acestora asupra sănătății	38
3.4.1. Beneficiile flavonolilor asupra sănătății umane	40
3.4.2. Beneficiile flavan-3-olilor asupra sănătății umane	41
3.4.3. Beneficiile antocianilor asupra sănătății umane	42
3.5. Procianidinele din vin și efectele acestora asupra sănătății	43
3.6. Stilbenii din vin și efectele acestora asupra sănătății	44

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

1. Obiective	49
2. Studiul 1. Profilul fenolic și activitatea antioxidantă a vinurilor românești provenite din șase soiuri de struguri autohtone	51
2.1. Introducere	51
2.2. Obiective	52
2.3. Materiale și metode	53
2.3.1. Probe și reactivi	53
2.3.2. Analiza HPLC-DAD-ESI/MS și UV-Vis	53
2.3.3. Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici	54
2.3.4. Determinarea conținutului total de compuși fenolici	54
2.3.5. Determinarea capacității antioxidante prin metoda DPPH	55
2.3.6. Analiza statistică	56
2.4. Rezultate	56
2.4.1. Profilul și compoziția fenolică a vinurilor analizate prin HPLC-DAD-ESI (+) MS	56
2.4.2. Analiza componentelor principale	63
2.4.3. Conținutul polifenolic total	64
2.4.4. Activitatea antioxidantă totală	65
2.4.5. Corelații între conținutul polifenolic total și activitatea antioxidantă totală	65
2.5. Discuții	68
2.5.1. Profilul și compoziția fenolică a vinurilor analizate prin HPLC-DAD-ESI (+) MS	68
2.5.2. Analiza componentelor principale	76
2.5.3. Conținutul polifenolic total	77
2.5.4. Activitatea antioxidantă totală	77
2.5.5. Corelații între conținutul polifenolic total și activitatea antioxidantă totală	78
2.6. Concluzii	78
3. Studiul 2. Evaluarea calității și autenticității diferitelor sortimente de vinuri românești folosind spectroscopia FT-MIR cuplată cu analiza multivariată a datelor	81
3.1. Introducere	81
3.2. Obiective	84
3.3. Materiale și metode	85
3.3.1. Probe de vin	85
3.3.2. Analiza spectroscopică în infraroșu cu transformată Fourier	85
3.3.3. Analiza multivariată a datelor	85
3.4. Rezultate	86
3.4.1. Amprentele spectrale FT-MIR ale probelor individuale de vin	86

3.4.2. Identificarea grupărilor funcționale specifice și a compușilor specifici în vinuri, în funcție de culoarea și dulceața lor	90
3.4.3. Analiza multivariată a datelor prin PCA	92
3.5. Discuții	95
3.5.1. Ampretele spectrale FT-MIR ale probelor individuale de vin	95
3.5.2. Identificarea grupărilor funcționale specifice și a compușilor specifici în vinuri, în funcție de culoarea și dulceața lor	96
3.5.3. Analiza multivariată a datelor prin PCA	97
3.6. Concluzii	98
4. Studiul 3. Efectele protectoare ale polifenolilor din vin asupra stresului oxidativ și hepatotoxicității induse prin administrarea acrilamidei la șobolani	99
4.1. Introducere	99
4.2. Obiective	101
4.3. Materiale și metode	102
4.3.1. Probe de vin și reactivi	102
4.3.2. Animale	102
4.3.3. Protocol experimental	103
4.3.4. Recoltarea probelor	103
4.3.5. Evaluarea histopatologică a țesutului hepatic	104
4.3.6. Evaluarea funcției hepatice	104
4.3.7. Prepararea omogenatelor tisulare hepatice	104
4.3.8. Dozarea proteinelor în omogenatele tisulare hepatice	104
4.3.9. Evaluarea stresului oxidativ prin intermediul biomarkerilor determinați în plasmă	105
4.3.10. Evaluarea stresului oxidativ în țesutul hepatic	106
4.3.11. Analiza statistică	108
4.4. Rezultate	109
4.4.1. Toxicitatea generală: evoluția greutatei corporale a animalelor, greutatea absolută și relativă a ficatului	109
4.4.2. Examenul histopatologic al ficatului de șobolan	110
4.4.3. Parametrii biochimici ai afectării hepatice	116
4.4.4. Efectele polifenolilor din vin asupra stresului oxidativ indus de acrilamidă evaluat prin concentrația plasmatică a unor biomarkeri	116
4.4.5. Efectele polifenolilor din vin asupra stresului oxidativ indus de acrilamidă la nivel hepatic	120
4.5. Discuții	124
4.5.1. Evoluția greutatei corporale a animalelor, greutatea absolută și relativă a ficatului	124
4.5.2. Examenul histopatologic al ficatului de șobolan	124
4.5.3. Parametrii biochimici ai afectării hepatice	125
4.5.4. Efectele polifenolilor din vin asupra stresului oxidativ indus de acrilamidă evaluat prin concentrația plasmatică a unor biomarkeri	126
4.5.5. Efectele polifenolilor din vin asupra stresului oxidativ indus de acrilamidă la nivel hepatic	127
4.6. Concluzii	130
5. Concluzii generale	131
6. Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei	133
REFERINȚE	135

CUVINTE CHEIE: vinuri românești, polifenoli, flavan-3-oli, flavonoli, antociani, stilbeni, activitate antioxidantă *in vitro*, HPLC-DAD-MS, calitatea și autenticitatea vinurilor, spectroscopia FT-MIR, analiza componentelor principale, stres oxidativ, acrilamidă, potențial antioxidant *in vivo*

Introducere

În ultimii ani, o mare atenție a fost acordată antioxidantilor alimentari și asocierii lor cu multiple beneficii asupra sănătății, multe dintre aceste studii concentrându-se asupra fenolilor dietari. Vinul roșu este o sursă excelentă de compuși fenolici și poate conține 1000-4000 mg/L de polifenoli, având diverse activități biologice care sunt atribuite în principal activităților lor antioxidante și antiradicalice puternice. Activitatea antioxidantă este în prezent considerată a fi una dintre caracteristicile cele mai importante ale vinurilor și este asociată cu conținutul de polifenoli.

În ceea ce privește consumul regulat de vin roșu, s-a emis ipoteza că ar reprezenta cauza cea mai probabilă pentru fenomenul cunoscut sub numele de "Paradoxul Francez". Majoritatea cercetătorilor au studiat și au raportat acțiunile vinului roșu, deoarece conține mai mulți compuși fenolici decât vinul alb, ca urmare a modului său de fermentație. Cu toate acestea, studiile epidemiologice recente, precum și cele *in vitro*, au sugerat faptul că vinul alb poate, de asemenea, proteja de boli cardiovasculare similar cu vinul roșu, având o capacitate semnificativă de a inhiba agregarea plachetară *in vitro* și de a crește expresia proteinelor cardioprotectoare. Totuși, atunci când vinurile roșii sunt privite ca alimente funcționale, este necesar să se acorde atenție unor constrângeri critice, cum ar fi factorii de gust, variația mare în conținutul total fenolic și corelația între funcționalitatea *in vitro* și *in vivo*.

În acest sens, lucrarea de față cuprinde un studiu complex privind compoziția fenolică detaliată și activitatea antioxidantă a vinurilor autohtone, realizând totodată comparații între vinurile albe, rozé și roșii și, de asemenea, între vinurile provenind din diferite regiuni geografice ale României, profilurile fenolice ale vinurilor servind ca instrumente valoroase pentru diferențierea soiurilor de vinuri. În continuare, calitatea și autenticitatea vinurilor au fost evaluate folosind spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) combinată cu metode de analiză statistică multivariată, pentru determinarea conținutului de derivați fenolici, carbohidrați, aminoacizi și acizi organici, în diferite vinuri, ca markeri de calitate și autenticitate. În cele din urmă, au fost testate efectele protectoare ale polifenolilor din vinurile autohtone, consecutive unui consum regulat al acestor vinuri, asupra stresului oxidativ, *in vivo*, la șobolani.

Studiul 1. Profilul fenolic și activitatea antioxidantă a vinurilor românești provenite din șase soiuri de struguri autohtone

Introducere

Consumul de vin este o practică comună și veche în România, țara noastră fiind unul dintre principalii producători și consumatori de vin, clasându-se pe locul al șaselea în UE în ceea ce privește cantitatea de vin produsă, după Italia, Franța, Spania, Portugalia și Germania. Deși vinurile românești prezintă mai multe particularități, care derivă din faptul că acestea sunt elaborate cu soiuri de struguri autohtone, care nu pot fi găsite în altă parte în lume, puține date referitoare la compoziția lor fenolică pot fi găsite în prezent, cu excepția unor parametri precum conținutul fenolic total și al unor fenoli individuali, cum ar fi resveratrolul. Din ceea ce știm, nu există date disponibile cu privire la conținutul de compuși fenolici individuali nevolatili al vinurilor din România și nici cu privire la activitatea antioxidantă *in vitro* a acestor vinuri.

Compoziția chimică a vinurilor stă la baza calității și autenticității lor. Profilul polifenolic al unui anumit soi reflectă în mare măsură potențialul său genetic și, prin urmare, poate fi utilizat ca un instrument pentru a diferenția între ele diverse soiuri. În acest sens, am analizat compoziția chimică a vinurilor obținute din soiuri de struguri autohtone, Fetească Albă (FA), Fetească Regală (FR), Băbească Rose (BR), Busuioacă de Bohotin (BB), Băbească Neagră (BN), Fetească Neagră (FN) și am comparat-o cu

cele ale soiurilor internaționale. Sortimentele de vinuri alese au fost obținute din soiuri de struguri cultivate în șase regiuni viticole importante din România.

Obiective: (i) caracterizarea unor probe de vinuri comercializate în România, din punct de vedere al compoziției chimice a acestora, prin cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC); (ii) determinarea conținutului total de polifenoli din aceste vinuri; (iii) determinarea activității antioxidante a vinurilor investigate; (iv) evaluarea potențialelor corelații existente între conținutul polifenolic total și activitatea antioxidantă a vinurilor roșii, rozé și albe studiate.

Materiale și metode

Un număr de cincisprezece probe de vinuri românești - roșii, rozé și albe - au fost folosite în acest studiu. Identificarea și cuantificarea compușilor fenolici din vinuri s-a realizat folosind tehnica HPLC-DAD-ESI(+).MS. Conținutul total de polifenoli (CTP) a fost determinat prin spectrofotometrie, folosind reactivul Folin-Ciocalteu (FC) și acidul galic ca standard de referință. Activitatea antioxidantă a vinurilor a fost determinată spectrofotometric, prin testul de apreciere a capacității de captare a radicalului liber DPPH•, folosind Trolox ca standard de referință.

Rezultate și discuții

Profilul și compoziția fenolică a vinurilor analizate prin HPLC-DAD-ESI (+) MS

Studiul de față a investigat prezența în vinurile românești a compușilor fenolici aparținând celor două clase principale de compuși, flavonoidici (flavan-3-oli, flavonoli și antociani) și non-flavonoidici (stilbeni), și a permis identificarea și cuantificarea unui număr total de 38 compuși fenolici, glicozide și agliconi, aparținând acestor clase. Rezultatele au arătat concentrații mai mari pentru compușii flavonoidici decât pentru cei non-flavonoidici, în toate vinurile analizate.

Flavan-3-olii. Trei flavan-3-oli monomeri au fost identificați în toate cele 15 vinuri studiate: (+)-catechina, galatul de epicatechină și galocatechina. În aproape toate probele, catechina fost cel mai abundent monomer flavan-3-olic, independent de tipul de vin sau de vârsta vinului. Variația mare obținută între concentrațiile flavan-3-olilor individuali, atât în cazul comparării celor trei tipuri de vinuri (albe, rozé și roșii), cât și la compararea vinurilor roșii între ele, poate fi atribuită soiului de struguri, caracteristicilor climatice și tehnicilor de vinificație diferite. În ceea ce privește conținutul total de flavanoli, s-au înregistrat variații mari între probele de vinuri roșii în funcție de soiul de struguri din care provin, probele de vin obținute din soiul FN având un conținut total de flavanoli mai mare decât vinurile produse din soiul BN.

Stilbenii. În toate vinurile analizate au fost identificați și cuantificați șase stilbeni: cinci forme diferite de stilbeni resveratrol-monomerici (*trans*-resveratrol, *trans*-piceid, resveratrol-5-O-glucozidă, piceatanol, pterostilben) și o singură formă resveratrol-dimerică (palidol). Vinurile roșii din regiunea viticolă a Dealurilor Moldovei (BN_{Panciu 2011}, FN_{Panciu 2011}, BN_{Husi 2009} și FN_{Cotesti 2008}) au avut cantități mai mari de *trans*-resveratrol decât vinurile roșii din celelalte regiuni viticole din România, indiferent de soiul de struguri sau vârsta vinului, aceste diferențe fiind legate de procesul de vinificație (care influențează extracția și difuzia fenolilor din struguri în vin), precum și de factorii de mediu (solul, originea geografică și condițiile climatice). Concentrațiile inferioare obținute pentru piceid, în comparație cu cele obținute pentru resveratrol, pot fi explicate prin hidroliza formelor glicozilate (piceid) prezente în vin, rezultând formele agliconice (resveratrol), odată cu maturarea vinurilor. De asemenea, valorile concentrațiilor obținute pentru *trans*-piceatanol au fost inferioare celor măsurate pentru *trans*-resveratrol. Nivelurile totale de stilbeni au arătat diferențe semnificative în funcție de soiul de struguri, regiunea viticolă și recoltă: vinul roșu FN_{Tohani 2010} a prezentat cel mai mare conținut de stilbeni (20,20 mg/L) și vinul alb FR_{Jidvei 2011} cel mai mic conținut (2,37 mg/L), concentrațiile celorlalte probe analizate variind în intervalul 4,69-17,69 mg/L pentru vinurile roșii, 6,87-7,15 mg/L pentru vinurile rozé și 2,37-5,86 mg/L pentru vinurile albe.

Flavonolii. Șaptesprezece flavonoli au fost identificați și cuantificați în vinurile autohtone românești, incluzând doisprezece flavonol-O-glicozide originare din struguri (3-O-glucozida, 3-O-galactozida și 3-O-glucuronida quercetinei, 3-O-glucozidele și 3-O-galactozidele miricetinei și izoramnetinei, 3-O-glucozidele și 3-O-(6-acetil)-glucozidele laricitrinei și siringetinei, împreună cu 3-O-glucozida camferolului) și cinci flavonoli agliconi liberi, eliberați de către acestea prin hidroliză în vin (miricetina, quercetina, izoramnetina, laricitrina, camferolul). În ceea ce privește grupul derivaților de miricetină, nici unul dintre sortimentele de vin alb nu a conținut agliconul miricetină și miricetin-3-O-galactozida, iar dintre vinurile rozé, în BR_{Panciu} 2012 nu s-a găsit agliconul miricetină. Dintre derivații quercetinei, doar quercetin-3-O-galactozida și quercetin-3-O-glucuronida au fost detectate și cuantificate în toate cele cincisprezece probe de vin. Quercetin-3-O-glucozida nu a fost detectată în vinul alb FR_{Recas} 2012, în timp ce agliconul quercetină nu a fost găsit în nici unul dintre sortimentele de vin alb și rozé. Aceste rezultate au confirmat faptul că ratele de hidroliză a glicozidelor flavonolice în vin au fost diferite, în funcție de tipul de aglicon flavonolic și, de asemenea, în raport cu natura componentei glucidice. Derivații izoramnetinei au dominat profilurile flavonolice în toate vinurile albe și rozé și, de asemenea, în șapte din cele nouă vinuri roșii investigate. Pentru celelalte două probe de vin roșu, derivații siringetinei au fost dominanți în vinul FN_{Ceptura} 2012 și derivații camferolului în vinul FN_{Tohani} 2010. Concentrațiile flavonol-O-glicozidelor găsite în toate vinurile studiate au fost mai mari decât ale agliconilor flavonolici, deoarece formele conjugate sunt mai stabile decât formele libere. Toate probele de vin au prezentat niveluri ridicate de flavonoli care descresc în ordinea: vinuri roșii (142,98-249,08 mg/L) > vinuri albe (78,02-106,03 mg/L) > vinuri rozé (57,18-75,13 mg/L). Rezultatele noastre au arătat o variabilitate care poate fi explicată prin mai mulți factori, cum ar fi soiul de struguri, gradul de maturare a strugurilor, procesul de vinificație și perioada de învechire a vinului. De asemenea, biosinteza crescută a polifenolilor, în special a flavonolilor, este mult influențată de expunerea la soare și temperatură, astfel încât vinurile obținute din struguri cultivați în zone mai însorite, calde, au avut un nivel mai ridicat de flavonoli.

Antocianii. Un număr total de doisprezece antociani au fost identificați în vinurile roșii analizate, în timp ce în vinurile rozé, având în vedere conținutul lor scăzut, aceștia nu au putut fi cuantificați. Antocianii identificați au fost monoglucozidele și, respectiv, derivații monoglucozidici a cinci antocianidine: cianidina, petunidina, delfinidina, peonidina și malvidina, iar derivații au fost 6-O-acetil și 6-O-cumaril. S-a observat că profilurile antocianilor și compoziția vinurilor nu au fost similare, prin urmare locația podgoriei a produs un efect selectiv asupra antocianilor individuali, chiar și în cazul vinurilor obținute din același soi de struguri. Formele antocianice ale delfinidinei au reprezentat clasa cea mai abundentă de antociani monomerici, urmate de cele ale malvidinei, peonidinei, petunidinei și cianidinei. Dintre antocianii non-acilați, malvidin-3-O-glucozida a fost singurul compus găsit în toate probele de vinuri roșii studiate, în timp ce antocianii acilați, constând în cinci antociani acetilați și doi derivați cumaril, au fost cuantificați în toate probele de vin roșu, având o mai bună stabilitate și solubilitate decât antocianii non-acilați. În ceea ce privește concentrația totală a antocianilor monomerici, pentru probele de vinuri BN aceasta a fost mai mică decât a vinurilor FN.

Analiza componentelor principale (PCA)

Analiza multivariată a datelor a avut ca rezultat identificarea a trei grupuri principale: primul a inclus vinurile albe, al doilea cele rozé și al treilea a inclus vinurile roșii. Primul grup a fost suprapus parțial peste cel de-al doilea pentru două vinuri albe, dar, în general, vinurile au fost în mod evident discriminate de-a lungul primei axe (PC1), în funcție de sortimentul de vin căruia îi aparțin (alb, rozé sau roșu). Rezultatele obținute prin PCA demonstrează că diferențele dintre probe sunt datorate variabilității soiurilor și culorii vinului, dar discriminarea probelor în funcție de regiunea geografică este mult mai dificil de realizat, luând în considerare doar compoziția fenolică.

Conținutul polifenolic total

Rezultatele obținute la determinarea CTP în vinurile românești analizate prin metoda FC au înregistrat variații între probele de vin alb, rozé și roșu. Conținutul total de polifenoli al vinurilor roșii a fost de până la 10 ori mai mare decât al celor rozé și albe. Aceste diferențe sunt rezultatul unei mai bune

extracții a compușilor fenolici, datorită timpului de contact mai lung cu pielea și semințele strugurilor, condițiilor de fermentare și temperaturii, pentru vinurile roșii, spre deosebire de cele albe. De asemenea, printre vinurile roșii s-au obținut diferențe semnificative între valorile CTP, conținutul fenolic al vinului FN_{Tohani 2010} (2359 mg GAE/L) fiind de 3 ori mai mare decât al vinului BN_{Panciu 2011} (801 mg GAE/L). CTP a variat între diferitele probe de vin, în funcție de soiul de struguri, factorii de mediu în podgorie, tehnicile de procesare a vinului, condițiile atmosferice și ale solului în timpul coacerii, și procesul de maturare a boabelor.

Activitatea antioxidantă totală

Valorile obținute pentru activitățile antioxidante ale vinurilor, determinate prin metoda radicalului liber DPPH·, au prezentat diferențe semnificative între cele 3 sortimente de vinuri analizate, albe, rozé și roșii. Astfel, capacitatea de inhibare a radicalului liber DPPH· a fost semnificativ mai mare în cazul probelor de vin roșu analizate față de cea a vinurilor albe și rozé. Cea mai puternică activitate anti-radicalică fost găsită în vinul roșu FN_{Toh2010}, care a avut cel mai mare conținut de compuși fenolici și cea mai scăzută activitate a fost obținută pentru vinul alb FA_{Cot2011}, care a avut cel mai mic conținut fenolic. Conținutul ridicat de compuși fenolici în vinurile roșii contribuie la activitatea antioxidantă crescută a acestora, în comparație cu cele ale vinurilor rozé și albe.

Corelații între conținutul polifenolic total și activitatea antioxidantă totală

Rezultatele noastre au arătat că activitatea antioxidantă a vinurilor testate nu a fost influențată direct de CTP, deoarece vinurile cu un CTP mai mare nu au prezentat întotdeauna cele mai mari valori ale activității antioxidante. Prin urmare, putem concluziona că activitatea antioxidantă a vinurilor este legată mai mult de tipul compușilor fenolici individuali găsiți în vinuri decât de conținutul total fenolic.

Concluzii

Acest studiu reprezintă prima cercetare fitochimică a componentelor fenolice din cincisprezece vinuri românești diferite, produse în zece centre viticole din România, din șase soiuri de struguri autohtone. Un total de 38 derivați fenolici individuali au fost identificați și cuantificați în probele de vin alb, rozé și roșu, prin tehnica HPLC-DAD-ESI(+)MS. Rezultatele obținute au relevat că probele de vin roșu s-au caracterizat printr-o concentrație fitochimică superioară și o capacitate antioxidantă mai mare decât probele de vin alb și rozé.

Prin analiza componentelor principale, au fost remarcate discriminări semnificative între probele de vin, datorită variabilității soiurilor și a culorii vinului, flavan-3-olii, ex. catechina, galatul de epicatechină și galocatechina, fiind în principal responsabili de discriminările dintre probele de vin grupate.

Conținutul total și individual al compușilor fenolici și activitatea antioxidantă, măsurată ca și capacitate de eliminare a radicalilor, au fost comparabile cu cele ale vinurilor produse din soiuri de struguri internaționale. Activitatea antioxidantă a vinurilor studiate pare să fie legată mai mult de tipul compușilor fenolici individuali decât de conținutul total fenolic și să se datoreze în principal flavan-3-olilor.

Rezultatele au confirmat faptul că vinurile românești testate reprezintă o sursă bună de antioxidanți și, prin urmare, un consum moderat poate avea o influență benefică asupra sănătății umane.

Studiul 2. Evaluarea calității și autenticității diferitelor sortimente de vinuri românești folosind spectroscopia FT-MIR cuplată cu analiza multivariată a datelor

Introducere

Calitatea și autenticitatea originii soiurilor de struguri și a vinurilor este de mare interes, atât pentru industria vinului cât și pentru consumatori. Tehnica spectroscopică în infraroșu cu transformată

Fourier, în combinație cu chemometria, este o tehnică rapidă și reproductibilă pentru identificarea autenticității și falsificării diferitelor produse alimentare și băuturi.

În lucrarea de față, spectroscopia în infraroșu mediu cu transformată Fourier (FT-MIR) a fost aplicată pentru a caracteriza 15 vinuri românești diferite (albe, rozé și roșii), obținute din diferite soiuri autentice, de origine denominată, găsite în diferite regiuni ale României. Vinurile au fost investigate prin reflexie totală atenuată (ATR) și componentele cele mai importante (fenoli, carbohidrați, aminoacizi și acizi organici) au fost localizate în regiunile de amprentă specifice ale spectrelor. Pe baza diferențelor dintre spectrele FT-MIR, prin analiza multivariată a datelor (analiza componentelor principale) s-au identificat factorii de discriminare specifici, utili pentru a autentifica originea regională și biologică (soiul), precum și indicii lor de dulceață.

Obiective: determinarea calității și autenticității vinurilor românești, utilizând metoda spectroscopică FT-IR cuplată cu metoda chemometrică de tip PCA.

Materiale și metode

Cincisprezece vinuri românești, incluzând vinuri albe ($n = 4$), rozé ($n = 2$) și roșii ($n = 9$), având indici diferiți de dulceață (5 seci, 7 demiseci și 3 demidulci), au fost supuse analizei în acest studiu. Spectrele FT-IR au fost înregistrate cu un spectrometru Shimadzu IR Prestige-21, pe domeniul de numere de undă $600\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, la o rezoluție spectrală de 4 cm^{-1} . Pentru fiecare spectru s-au mediat 64 de scanări. Chemometria avansată a fost aplicată pentru a discrimina diferitele probe de vin, pe baza culorii lor și a conținutului de derivați fenolici, aminoacizi, acizi organici, precum și carbohidrați.

Rezultate și discuții

Ampretele spectrale FT-MIR ale probelor individuale de vin

Spectrele FT-IR pentru toate probele de vin analizate au prezentat forme spectrale similare, dar cu modificări cantitative specifice în regiunea de amprentă ($1800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$). Picurile caracteristice identificate în zona ampretei spectrale sugerează prezența în probele de vin a compușilor constituenți: apă, etanol, aldehide, glicerol, aminoacizi, esteri, minerale, polifenoli, zaharuri și acizi organici. Comparând formele spectrelor, au fost identificate patru regiuni diferite (1-4): regiunea $600\text{-}940\text{ cm}^{-1}$ (1) corespunde derivaților fenolici (inclusiv esteri), regiunea $970\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ (2) carbohidraților (glucoză, fructoză și oligozaharide, în special zaharoză), regiunea $1600\text{-}1716\text{ cm}^{-1}$ (3) aminoacizilor liberi, peptidelor și acizilor organici, și regiunea $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ (4) poliolorilor (în principal glicerol). Regiunile 1-4 au putut demonstra diferențele specifice dintre probe, legate de culoarea celor 3 tipuri de vinuri (albe, rozé și roșii), și dulceața lor, în funcție de conținutul în zaharuri (seci, demiseci și demidulci).

Identificarea grupărilor funcționale specifice și a compușilor specifici în vinuri, în funcție de culoarea și dulceața lor

Domeniul $600\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ a fost considerat ca "regiune de amprentă", fiind util pentru a diferenția vinurile în funcție de indicele lor dulceață (sec vs demisec și demidulce). S-a observat că în regiunea (1) absorbțiile au fost determinate în principal de polifenoli, regiunea (2) a fost specifică pentru carbohidrați, în principal glucoză (1033 cm^{-1}) dar, de asemenea, fructoză și zaharoză (1100 cm^{-1}), iar regiunea (3) a fost specifică aminoacizilor ($1602\text{-}1608\text{ cm}^{-1}$) și acizilor organici (1700 cm^{-1}).

Valorile intensităților picurilor de la 1033 , 1100 , 1600 și 1700 cm^{-1} au fost utilizate ca markeri cantitativi atât ai diferențelor dintre vinurile individuale cât și ai diferențelor dintre tipurile de vin (pe baza culorii și a indicelui de dulceață). Raporturile $1033/1100\text{ cm}^{-1}$ și $1600/1700\text{ cm}^{-1}$ au fost, de asemenea, folosite pentru a caracteriza cantitativ dulceața revendicată pe eticheta acestor vinuri (sec, demisec, demidulce).

Diferența dintre ampretele FT-IR ale vinurilor a constat în raportul diferit al intensității unor benzi specifice identificate în probele de vin. Astfel, banda datorată glucozei, de la 1033 cm^{-1} , a avut intensitate mai ridicată în vinurile demidulci decât în cele seci, acest lucru fiind explicat de prezența

glucozei în cantitate mai mare în vinurile demidulci. De asemenea, raportul intensității picurilor corespunzătoare glucozei, respectiv fructozei + zaharozei ($1033/1100 \text{ cm}^{-1}$), a fost mai ridicat în cazul vinurilor demidulci comparativ cu vinurile seci și demisecei.

În ceea ce privește aciditatea vinurilor, s-a observat că banda de la 1700 cm^{-1} , corespunzătoare acizilor organici, a avut cea mai mare intensitate în cazul vinurilor albe, urmate de vinurile rozé, cea mai mică intensitate a picurilor fiind obținută în cazul vinurilor roșii. Acest lucru indică faptul că aciditatea vinurilor descrește în ordinea vinuri albe > vinuri rozé > vinuri roșii. În cadrul vinurilor roșii, probele nr. 8, 10, 13 și 14 au înregistrat o intensitate mai crescută a picurilor corespunzătoare acizilor organici față de restul vinurilor roșii, indicând o aciditate similară a acestor probe cu cea a vinurilor rozé.

Analiza multivariată a datelor prin PCA

Pentru întreaga regiune de amprentă ($600-1800 \text{ cm}^{-1}$), primele două componente principale, PC1 și PC2, au explicat 90% din întreaga variabilitate a probelor de vin, arătând o asemănare bună pentru vinurile albe și pentru vinurile rozé, vinurile roșii fiind mai heterogene în compoziție și răspândite atât în partea superioară cât și în cea inferioară a plotului, nefiind grupate într-un anumit grup. Cu toate acestea, vinurile roșii demidulci au fost situate aproape de vinurile rozé, care s-au dovedit a fi superioare în dulceață.

Pentru regiunea $970-1100 \text{ cm}^{-1}$, specifică pentru carbohidrați, și pentru regiunea $1600-1716 \text{ cm}^{-1}$, specifică aminoacizilor și acizilor organici, primele două componente, PC1 și PC2, au explicat, un procent mare, de 97%, din întreaga variabilitate a probelor de vin, sugerând o grupare bună în funcție de culoarea lor, indicele de dulceață și aciditate. Pentru regiunea $750-940 \text{ cm}^{-1}$, specifică derivaților fenolici, deși varianța explicată a fost mare (98%), s-a obținut o grupare mai slabă a vinurilor pe baza diferențelor de culoare. În acest caz, vinurile au fost discriminate de-a lungul axei PC2, în funcție de tipul de vin cărui îi aparțin (alb, rozé sau roșu), cele trei grupuri fiind parțial suprapuse între ele, suprapunerile datorându-se relației strânse existente între unele dintre vinurile care provin din aceeași podgorie sau de la același producător.

Analiza multivariată a datelor a arătat că toate cele patru componente ale vinurilor (fenoli, carbohidrați, aminoacizi, acizi organici) care contribuie la culoare, dulceață și aciditate sunt responsabile pentru gruparea semnificativă, bună, a acestor vinuri.

Concluzii

Acest studiu a demonstrat că spectroscopia MIR, cuplată cu analiza componentelor principale, reprezintă un instrument puternic pentru diferențierea grupurilor care au proprietăți similare, dar prezintă diferențe generale consistente, putând fi folosită ca tehnică pentru discriminarea diferitelor varietăți de vinuri albe, rozé și roșii. De asemenea, analiza ATR-FT-MIR s-a dovedit a fi un instrument foarte rapid, ieftin și eficient pentru a evalua calitatea și autenticitatea vinurilor și pentru a discrimina fiecare categorie de vin, pe baza culorii lor și a indicelui de dulceață al acestora, ca urmare a specificității lor biologice.

Utilizarea acestei tehnici rapide poate oferi beneficii pentru industria vinicolă, fiind un instrument solid de screening rapid pentru discriminarea diferitelor tipuri de vin, capabil să evalueze calitatea vinului, asigurând consumatorii de calitatea produsului final.

Studiul 3. Efectele protectoare ale polifenolilor din vin asupra stresului oxidativ și hepatotoxicității induse prin administrarea acrilamidei la șobolani

Introducere

Evaluarea markerilor de calitate și a activității antioxidante *in vitro* a vinurilor românești a constituit un punct de plecare util pentru investigarea potențialului lor antioxidant *in vivo*. Prin urmare, prezentul studiu a fost proiectat pentru a evalua efectele antioxidante protectoare ale substanțelor

biologic active din vin împotriva stresului oxidativ și a toxicității hepatice induse experimental de acrilamidă (ACR) la șobolani Wistar.

Deoarece la ora actuală există insuficiente studii efectuate pe modele cronice care să demonstreze relația dintre biodisponibilitatea compușilor fenolici și efectele lor antioxidante, acest experiment a urmărit evaluarea relației dintre funcționalitatea vinurilor *in vitro* și *in vivo*, și anume măsura în care amploarea răspunsului antioxidant *in vivo* este proporțională cu activitatea antioxidantă *in vitro* a vinurilor.

Obiective: (i) investigarea efectelor antioxidante *in vivo* a două probe de vin, cu activitate antioxidantă *in vitro* crescută, respectiv redusă, asupra stresului oxidativ indus de ACR, prin intermediul biomarkerilor determinați în plasmă și în țesutul hepatic; (ii) evaluarea potențialelor efecte protectoare ale polifenolilor din aceste probe de vin asupra leziunilor hepatocelulare produse de ACR la șobolani prin determinarea enzimelor hepatice; (iii) studiul comparativ al modificărilor histopatologice apărute la șobolanii tratați cu ACR după suplimentarea dietei cu cele 2 probe diferite de vin.

Materiale și metode

Cele două probe de vin folosite în acest studiu sunt: vinul roșu Fetească Neagră (12,5% etanol (v/v)), cu un CTP de 2359 mg GAE/L și o activitate antioxidantă *in vitro* de 9,84 mM TE/L, și vinul alb Fetească Regală (12,5% etanol (v/v)), cu un CTP de 245 mg GAE/L și o activitate antioxidantă *in vitro* de 0,93 mM TE/L.

S-a utilizat o colectivitate de 60 șobolani albi, sușa Wistar, masculi, cu greutatea inițială de 150±14 g. Toate procedurile și tratamentele animalelor în acest studiu au fost efectuate respectând normele de bioetică în cercetarea pe animale de experiență în scop științific și au fost aprobate de Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca (România) (număr protocol 219/11.06.2014). Animalele au fost împărțite randomizat în șase loturi, fiecare lot fiind alcătuit din zece animale, care timp de 28 de zile au primit zilnic prin gavaj intragastric tratamentele stabilite conform Protocolului experimental descris în teză.

Transaminazele, aspartat aminotransferaza (ASAT) și alanin aminotransferaza (ALAT), au fost determinate în probele de plasmă prin teste spectrofotometrice. Determinarea nivelului peroxidării lipidelor prin cuantificarea malondialdehidei (MDA) în plasma de șobolan s-a realizat prin tehnica UPLC-PDA. Determinarea nivelului plasmatic al glutatationului (GSH) redus și total s-a realizat prin tehnica UPLC-FLD. Probele de țesut hepatic prelevate după sacrificarea animalelor au servit ulterior pentru examenul histopatologic al țesutului hepatic și pentru determinarea prin metode spectrofotometrice a următorilor biomarkeri de stres oxidativ: MDA, GSH redus și activitatea enzimelor antioxidante (superoxid dismutaza (SOD), catalaza (CAT) și glutatation peroxidaza (GPx)).

Rezultate și discuții

Toxicitatea generală: evoluția greutății corporale a animalelor, greutatea absolută și relativă a ficatului

Hepatotoxicitatea cauzată de ACR a condus la creșterea dimensiunii ficatului la loturile tratate cu ACR, această mărire a ficatului putând fi datorată proliferării hepatocitelor ca rezultat al hiperplaziei induse chimic, măririi volumului hepatocitelor individuale, sau pur și simplu se poate datora infiltrării cu celule limfo-histiocitare. Rezultatele obținute sugerează că administrarea concomitentă a probelor de vin, alb sau roșu, la șobolanii tratați cu ACR nu a determinat o modificare a valorilor greutății corporale, greutății relative și absolute a ficatului în direcția valorilor obținute pentru lotul control (C).

Examenul histopatologic al ficatului de șobolan

Examenul histopatologic al ficatului pentru lotul C a relevat o histoarhitectonică asemănătoare cu cea a loturilor care au primit vin alb (VA) și, respectiv vin roșu (VR), modificările morfologice la aceste 3 loturi fiind discrete, consecutive consumului subacut de alcool.

Imaginile obținute în urma evaluării histopatologice la animalele din loturile tratate cu ACR au reliefat modificări morfologice ușoare, diferențele observate între cele 3 loturi fiind minore. Cele mai afectate au fost loturile martor pozitiv (MP) și vin alb+acrilamidă (VA+ACR). Absența unui efect protector hepatic evident al vinului roșu poate fi consecința unei durate prea scurte a studiului experimental, care s-a întins pe o perioadă de 4 săptămâni, administrarea vinului fiind subacută în acest caz, în timp ce efectele protectoare hepatice ale polifenolilor au fost raportate în urma unui consum de vin roșu pe termen mai îndelungat.

Parametrii biochimici ai afectării hepatice

Evoluția valorilor ALAT și ASAT a evidențiat creșteri semnificative ($p < 0,05$) ale activităților acestor enzime în cazul lotului tratat cu ACR comparativ cu lotul C, sugerând permeabilizarea membranei hepatocitelor și migrarea ALAT și ASAT în spațiul intercelular. Rezultatele obținute pentru ASAT au indicat că polifenolii din vinul roșu au conferit un efect protector împotriva toxicității acrilamidei în ficat la lotul tratat cu vin roșu+acrilamidă (VR+ACR). Această protecție nu a fost confirmată însă și prin valorile obținute pentru ALAT la lotul VR+ACR, comparativ cu grupul MP, în acest caz observându-se doar o tendință de normalizare a valorilor ALAT în direcția valorilor obținute pentru lotul C. Lipsa unei protecții evidente se poate datora suplimentării dietei cu vin pe o perioadă prea scurtă, efectele polifenolilor fiind vizibile doar în urma administrării cronice a vinului. Rezultatele obținute pentru transaminaze sunt în concordanță cu studiile histopatologice ale țesuturilor hepatice.

Efectele polifenolilor din vin asupra stresului oxidativ indus de acrilamidă evaluat prin concentrația plasmatică a unor biomarkeri

Datele obținute în acest studiu au arătat că ACR a produs creșterea peroxidării lipidelor, exprimată prin creșterea nivelului plasmatic al MDA. Scăderea concentrației plasmatice a MDA observată în studiu la loturile VA+ACR și VR+ACR sugerează că întregul proces de peroxidare lipidică a fost diminuat prin suplimentarea regulată a dietei cu vin.

Efectele antioxidante ale vinurilor au fost demonstrate, de asemenea, prin rezultatele obținute pentru cei doi parametri, GSH redus și raportul GSH redus/GSH total, în plasma animalelor. Astfel, o creștere semnificativă ($p < 0,05$) a nivelului plasmatic de GSH redus a fost evidentă atât la lotul VA+ACR cât și la lotul VR+ACR, comparativ cu lotul MP, în timp ce raportul GSH redus/GSH total a fost semnificativ crescut ($p < 0,05$) doar la lotul VR+ACR. Acest lucru a demonstrat că ingestia de vin a avut ca rezultat un efect protector, datorită antioxidanților fenolici prezenți în cele două tipuri de vin, dar efectul protector a fost semnificativ mai pronunțat pentru vinul roșu, care prezintă un conținut fenolic superior vinului alb.

Efectele polifenolilor din vin asupra stresului oxidativ indus de acrilamidă la nivel hepatic

Efectele polifenolilor din vin asupra peroxidării lipidice și nivelului hepatic al glutathionului redus. În prezentul studiu, reducerea nivelurilor tisulare hepatice ale GSH, și respectiv creșterea gradului de peroxidare lipidică la lotul tratat cu ACR față de lotul control, pot fi explicate prin reacția dintre ACR și GSH, reacție care determină epuizarea GSH și creșterea peroxidării lipidice. În același timp, odată cu administrarea vinurilor s-a observat reducerea nivelurilor de MDA și creșterea valorilor GSH, datorită efectelor antioxidante protectoare ale polifenolilor constituenți. Astfel, suplimentarea atât cu vin alb cât și cu vin roșu a dietei șobolanilor tratați cu ACR, a redus semnificativ ($p < 0,05$) nivelul hepatic al MDA la cele 2 loturi, comparativ cu lotul tratat doar cu ACR. Aceste constatări demonstrează că leziunile oxidative induse de ACR în ficat au fost ameliorate atât prin tratarea cu vinul alb, dar mai ales prin tratarea cu vinul roșu. Spre deosebire de rezultatele obținute pentru MDA, unde suplimentarea cu vin alb a conferit un efect protector împotriva ACR, în cazul GSH hepatic efectul suplimentării cu vin alb a fost slab, fără a oferi protecție prin creșterea semnificativă a nivelului GSH redus.

Efectele polifenolilor din vin asupra activităților enzimelor antioxidante hepatice. Niveluri scăzute ale activităților enzimice ale catalazei, superoxid dismutazei și glutathion peroxidazei au fost înregistrate în țesuturile hepatice ale șobolanilor din lotul tratat cu ACR, comparativ cu lotul C, sugerând leziuni acute

cauzate de ACR. Efectele nocive ale ACR în ficat s-au redus odată cu administrarea vinurilor, observându-se o modificare a nivelului CAT și SOD spre nivelul normal în funcție de tipul de vin administrat.

Analiza statistică a arătat că tipul de vin administrat a influențat activitatea SOD și CAT, dar nu a prezentat nici un efect semnificativ pentru GPX. Astfel, suplimentarea dietei cu vin roșu la lotul tratat cu ACR a determinat o creștere semnificativă ($p < 0,05$) a activității enzimatice a SOD și a CAT, comparativ cu lotul tratat doar cu ACR, în timp ce suplimentarea dietei cu vin alb nu a produs diferențe semnificative ale activităților acestor enzime. Efectele de ameliorare ale vinului roșu au fost mai pronunțate decât cele determinate de vinul alb, datorită conținutului său polifenolic superior comparativ cu al vinului alb. În ceea ce privește activitatea GPx, suplimentarea dietei cu vin alb sau roșu nu a produs diferențe semnificative între loturile tratate cu ACR, sugerând că în acest caz nici unul din cele 2 tipuri de vin nu a reușit să exercite un efect protector împotriva ACR.

Concluzii

În studiul de față, acrilamida a cauzat perturbări ale statusului oxidativ și activităților enzimatice, rezultatele obținute pentru parametrii biochimici ai afectării hepatice, examenul histopatologic al țesutului hepatic și parametrii de stres oxidativ studiați confirmând eficiența utilizării acrilamidei în generarea stării de stres oxidativ.

Rezultatele noastre au indicat că vinul roșu, având un conținut fenolic total și o activitate antioxidantă *in vitro* mai mare comparativ cu vinul alb, a fost în măsură să confere o protecție a ficatului față de stresul oxidativ, chiar și în timpul expunerii subacute la etanol, observându-se efecte semnificative statistic, atât la nivel hepatic cât și asupra markerilor evaluați în plasmă. Efectele protectoare superioare ale vinului roșu s-au datorat componentelor nealcoolice ale acestuia.

Parametrii biochimici au prezentat o îmbunătățire doar în cazul nivelului ASAT, iar examenul histopatologic a relevat doar o atenuare moderată a modificărilor morfologice, consecutiv suplimentării dietei cu vin roșu timp de 4 săptămâni, cel mai probabil datorită perioadei prea scurte de administrare.

Obiectivul principal al acestui studiu a fost atins, deoarece grupurile noastre experimentale au reușit să demonstreze o variație a intensității efectelor protectoare *in vivo*, în funcție de sortimentul de vin administrat, astfel încât efectele protectoare asupra modelului de stres oxidativ indus de acrilamidă au fost mai pronunțate la doze mai mari de polifenoli, cum a fost cazul vinului roșu.

Concluzii generale

Cercetările efectuate în vederea caracterizării vinurilor și a studierii potențialului lor antioxidant *in vitro* și *in vivo* au condus la următoarele concluzii:

- Analiza HPLC-DAD-ESI(+)-MS a permis stabilirea profilului fenolic complet și a furnizat compoziția generală a vinurilor, oferind informații valoroase cu privire la principalii compuși fenolici individuali aparținând claselor de compuși flavonoidici (flavan-3-oli, flavonoli și antociani) și non-flavonoidici (stilbeni).
- Evaluarea comparativă a conținutului fenolic individual, respectiv total, precum și a activității antioxidante a celor cincisprezece probe de vinuri analizate a evidențiat variații ale valorilor obținute atât între cele trei sortimente de vinuri albe, rozé și roșii cât și între probe diferite aparținând aceluiași sortiment de vin, astfel: vinurile roșii au prezentat o capacitate antioxidantă superioară și niveluri ale conținutului fenolic total și ale concentrațiilor compușilor fenolici individuali semnificativ mai mari, comparativ cu vinurile albe și rozé; între probele de vinuri roșii analizate s-au înregistrat variații ale activității antioxidante și ale compoziției fenolice, în funcție de soiul de struguri și originea geografică.
- Corelațiile dintre conținutul polifenolic total și activitatea antioxidantă a vinurilor au indicat că aceasta din urmă a fost influențată mai degrabă de profilul compușilor fenolici individuali iar conținutul polifenolic total nu poate fi considerat un criteriu major pentru estimarea capacității antioxidante.

- Analiza spectroscopică FT-IR cuplată cu analiza multivariată a datelor a permis caracterizarea și compararea celor cincisprezece probe de vin în funcție de culoare, indice de dulceață și aciditate, pe baza amprentelor specifice celor patru regiuni de absorbție caracteristice, corespunzătoare grupelor componente principale din vin: derivați fenolici, carbohidrați, aminoacizi și acizi organici.
- Evaluarea calitativă a fiecărei categorii componente a făcut posibilă discriminarea fiecărui sortiment de vin, de la roșu, la rozé și alb – în ceea ce privește culoarea, respectiv de la sec, la demisec și demidulce – în ceea ce privește gustul/dulceața, demonstrând că analiza ATR-FT-MIR este un instrument foarte rapid, ieftin și eficient pentru a evalua calitatea și autenticitatea vinurilor.
- Evaluarea biomarkerilor de stres oxidativ, a parametrilor biochimici ai afectării hepatice și a modificărilor histopatologice la șobolani a evidențiat perturbări ale statusului oxidativ și ale activităților enzimatică și modificări morfologice la nivel hepatic consecutive intoxicației subacute cu doze reduse de acrilamidă, confirmând eficiența utilizării acrilamidei în generarea stării de stres oxidativ.
- Asocierea administrării acrilamidei cu suplimentarea simultană a dietei șobolanilor cu vin alb, respectiv cu vin roșu, a evidențiat intervenția benefică a polifenolilor din vin prin normalizarea biomarkerilor evaluați la nivel hepatic și plasmatic și prin reducerea modificărilor morfologice hepatice în cazul suplimentării cu vin roșu, efectele protectoare ale vinului roșu asupra modelului de stres oxidativ indus de acrilamidă fiind semnificativ mai pronunțate decât ale vinului alb.
- Potențialul antioxidant *in vivo* al vinurilor a fost diferit în funcție de sortimentul de vin administrat, protecția superioară conferită de vinul roșu comparativ cu vinul alb datorându-se unui conținut fenolic și unei activități antioxidante *in vitro* ale vinului roșu de aproximativ zece ori mai crescute decât ale vinului alb.

Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei

Nota de originalitate a tezei este imprimată de studierea exclusivă a vinurilor românești obținute din soiuri de struguri de vin autohtone. Studiul compoziției fenolice a vinurilor reprezintă o temă care a atras mare interes în ultimii ani datorită proprietăților antioxidante ale polifenolilor din vin și numeroaselor efecte benefice asupra sănătății atribuite acestor compuși.

Prezenta lucrare prezintă prima cercetare fitochimică a componentelor fenolice din cincisprezece vinuri românești, produse în diferite centre viticole din România, din șase soiuri de struguri autohtone. Această cercetare a realizat pentru prima dată o caracterizare a sortimentelor de vinuri albe, rozé și roșii din România, printr-o analiză extinsă și comparativă atât a compușilor constituenți aparținând principalelor clase și subclase de compuși fenolici, cât și a fiecărei categorii de vin, pe baza culorii lor și a indicelui de dulceață al acestora, ca urmare a specificității lor biologice.

Întrucât până în prezent nu au fost publicate cercetări privind caracteristicile compoziționale fenolice și parametrii antioxidanți pentru vinurile produse în România din varietățile studiate în această lucrare, iar la nivel național și internațional cercetările s-au orientat îndeosebi spre vinurile roșii, prezenta lucrare aduce noi informații cu privire la profilul fitochimic deloc de neglijat al celor trei sortimente de vinuri și potențialul lor antioxidant *in vitro*. De asemenea, lucrarea prezintă prima cercetare care evaluează potențialul antioxidant *in vivo* a două sortimente diferite de vinuri românești și relația dintre funcționalitatea vinurilor *in vitro* și *in vivo*, furnizând date importante cu privire la efectele protectoare ale compușilor bioactivi din aceste vinuri asupra stresului oxidativ.

În cele din urmă, această teză oferă informații valoroase referitoare la valoarea nutraceutică a vinurilor românești testate, care s-au dovedit a fi o sursă importantă de antioxidanți. Ținând cont de faptul că vinul reprezintă o componentă cheie a dietei mediteraneene, care este un regim alimentar model pentru prevenirea mai multor boli grave, aceste informații cu privire la beneficiile polifenolilor din vinurile românești ar putea fi de mare interes pentru nutriția umană, servind pentru încurajarea formării unor obiceiuri alimentare sănătoase și a adoptării unui stil de viață sănătos.

Bibliografie selectivă

3. Paixão N, Perestrelo R, Marques JC, Câmara JS. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem.* 2007; 105:204-214.
11. Guerrero RF, García-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E. Wine, resveratrol and health: a review. *Nat Prod Commun.* 2009; 4(5):635-658.
17. Banc R, Socaciu C, Miere D, Filip L, Cozma A, Stanciu O, Loghin F. Benefits of wine polyphenols on human health: A review. *Bulletin UASVM Food Science and Technology.* 2014; 71(2):79-87.
66. Lorrain B, Ky I, Pechamat L, Teissedre PL. Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines, and extracts. *Molecules.* 2013; 18:1076-1100.
193. Jiang B, Zhang ZW. Comparison on phenolic compounds and antioxidant properties of Cabernet Sauvignon and Merlot wines from four wine grape-growing regions in China. *Molecules.* 2012; 17:8804-8821.
237. Banc R, Loghin F, Miere D, Fetea F, Socaciu C. Romanian wines quality and authenticity using FT-MIR spectroscopy coupled with multivariate data analysis. *Not Bot Horti Agrobo.* 2014; DOI:10.15835/nbha4229674.
282. Todașcă MC, Chira N, Deleanu C, Roșca S. Romanian wine study using IR spectroscopy in comparison with 1H-NMR. *UPB Sci Bull, Series B.* 2007; 69(4):1-8.
284. Socaciu C, Ranga F, Fetea F, Leopold L, Dulf F, Parlog R. Complementary advanced techniques applied for plant and food authentication. *Czech J Food Sci.* 2009b; 27:S70-S75.
292. Gris EF, Mattivi F, Ferreira EA, Vrhovsek U, Filho DW, Pedrosa RC, Bordignon-Luiz MT. Phenolic profile and effect of regular consumption of Brazilian red wines on in vivo antioxidant activity. *J Food Compos Anal.* 2013;31:31-40.
330. Uzma N, Kumar BS, Anees S. Red wine ameliorates CCl₄ – induced acute liver injury in rats. *Australian Journal of Biomedical Science.* 2011; 1(1):1-7.
332. Alturfan AA, Tozan-Beceran A, Sehirli AO, Demiralp E, Sener G, Omurtag GZ. Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(4):4589-4596.
336. Macedo LF, Rogero MM, Guimarães JP, Granato D, Lobato LP, Castro IA. Effect of red wines with different in vitro antioxidant activity on oxidative stress of high-fat diet rats. *Food Chem.* 2013; 137(1-4):122-129.

SUMMARY OF THE PhD THESIS

Research on the antioxidant activity of phenolic compounds from Romanian wines

PhD Student **Roxana Banc**

Scientific supervisor **Prof. Dr. Felicia Loghin**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
REVIEW OF THE LITERATURE	
1. General considerations on antioxidant phenolic compounds from wine composition	19
1.1. General aspects on the phenolic composition of wines	19
1.2. Phenolic compounds present in wines: classification, structure	20
1.2.1. Phenolic acids	20
1.2.1.1. Hydroxybenzoic acids	21
1.2.1.2. Hydroxycinnamic acids	21
1.2.2. Flavonoids	21
1.2.2.1. Flavones	22
1.2.2.2. Flavanones	23
1.2.2.3. Flavonols	23
1.2.2.4. Flavononols	23
1.2.2.5. Flavanes	24
1.2.2.6. Flavan-3-ols	24
1.2.2.7. Chalcones and dihydrochalcones	24
1.2.2.8. Anthocyanic pigments	24
1.2.3. Tannins	26
1.2.3.1. Hydrolyzable tannins	26
1.2.3.2. Condensed tannins	26
1.2.4. Stilbenes	27
1.2.5. Coumarins	28
1.2.6. Phenylethanol derivatives	28
1.2.7. Lignans and neolignans	28
2. Techniques and methods of analysis used in the study of phenolic compounds from wine	29
2.1. Extraction of phenolic compounds from grapes and wine	29
2.1.1. Phenolic extraction from grape to wine: methods for prediction	29
2.2. Wine analysis: quantification and separation of polyphenols	30
2.2.1. Spectrophotometric methods used to quantify phenolic classes and total phenols	30
2.2.2. Chromatographic techniques used in separation, qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds	31
2.2.2.1. High performance liquid chromatography (HPLC)	31
2.2.2.2. Ultra-high performance liquid chromatography (UPLC)	32
2.2.2.3. Gas chromatography (GC)	32
2.3. Other methods for the separation and quantification of the polyphenols	33
2.3.1. Capillary electrophoresis (CE)	33
2.4. Spectral methods used in elucidating the structure and characterization of phenolic compounds	33
2.4.1. Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)	33
2.4.2. Infrared spectroscopy (IR)	33
2.5. Methods for assessing antioxidant activity of wines	34
3. The effects of wine phenolic compounds on human health	35

3.1. The benefits of moderate wine consumption on health	35
3.2. The bioavailability of the phenolic compounds	36
3.3. Wine phenolic acids and their effects on health	37
3.4. Wine flavonoids and their effects on health	38
3.4.1. Flavonols benefits on human health	40
3.4.2. Flavan-3-ols benefits on human health	41
3.4.3. The benefits of anthocyanins on human health	42
3.5. Wine procyanidins and their effects on health	43
3.6. Wine stilbenes and their effects on health	44
PERSONAL CONTRIBUTIONS	
1. Aims	49
2. Study 1. Phenolic profile and antioxidant activity of Romanian wines, originating from six native grape varieties	51
2.1. Introduction	51
2.2. Aims	52
2.3. Materials and methods	53
2.3.1. Samples and reagents	53
2.3.2. UV-VIS and HPLC-DAD-ESI/MS analysis	53
2.3.3. Identification and quantification of phenolics	54
2.3.4. Determination of total phenolic compounds content	54
2.3.5. Determination of antioxidant capacity by DPPH method	55
2.3.6. Statistical analysis	56
2.4. Results	56
2.4.1. Profile and phenolic composition of the wines analyzed by HPLC-DAD-ESI (+) MS	56
2.4.2. Principal component analysis	63
2.4.3. Total polyphenolic content	64
2.4.4. Total antioxidant activity	65
2.4.5. Correlations between total phenolic content and total antioxidant activity	65
2.5. Discussion	68
2.5.1. Profile and phenolic composition of the wines analyzed by HPLC-DAD-ESI (+) MS	68
2.5.2. Principal component analysis	76
2.5.3. Total polyphenolic content	77
2.5.4. Total antioxidant activity	77
2.5.5. Correlations between total phenolic content and total antioxidant activity	78
2.6. Conclusions	78
3. Study 2. Evaluation of Different Romanian Wines Quality and Authenticity Using FT-MIR Spectroscopy Coupled with Multivariate Data Analysis	81
3.1. Introduction	81
3.2. Aims	84
3.3. Materials and methods	85
3.3.1. Wine samples	85
3.3.2. Fourier transformed infrared spectroscopic analysis	85
3.3.3. Multivariate data analysis	85
3.4. Results	86
3.4.1. FT-MIR spectral fingerprinting of individual wine samples	86
3.4.2. Identification of specific functional groups and specific compounds in wines, depending on their colour and sweetness	90

3.4.3. Multivariate data analysis by PCA	92
3.5. Discussion	95
3.5.1. FT-MIR spectral fingerprinting of individual wine samples	95
3.5.2. Identification of specific functional groups and specific compounds in wines, depending on their colour and sweetness	96
3.5.3. Multivariate data analysis by PCA	97
3.6. Conclusions	98
4. Study 3. The protective effects of wine polyphenols on oxidative stress and hepatotoxicity induced by administration of acrylamide in rats	99
4.1. Introduction	99
4.2. Aims	101
4.3. Materials and methods	102
4.3.1. Wine samples and reagents	102
4.3.2. Animals	102
4.3.3. Experimental protocol	103
4.3.4. Sampling	103
4.3.5. Histopathological evaluation of liver tissue	104
4.3.6. Assessment of liver function	104
4.3.7. Preparation of liver tissue homogenates	104
4.3.8. Dosage of proteins in liver tissue homogenates	104
4.3.9. Evaluation of oxidative stress by means of biomarkers determined in plasma	105
4.3.10. Evaluation of oxidative stress in the liver tissue	106
4.3.11. Statistical analysis	108
4.4. Results	109
4.4.1. General toxicity: evolution of animal body weight, absolute and relative liver weight	109
4.4.2. Histopathological examination of rat liver	110
4.4.3. Biochemical parameters of liver damage	116
4.4.4. The effects of wine polyphenols on oxidative stress induced by acrylamide evaluated by plasma concentration of certain biomarkers	116
4.4.5. The effects of wine polyphenols on oxidative stress induced by acrylamide in the liver	120
4.5. Discussion	124
4.5.1. Evolution of animal body weight, absolute and relative liver weight	124
4.5.2. Histopathological examination of rat liver	124
4.5.3. Biochemical parameters of liver damage	125
4.5.4. The effects of wine polyphenols on oxidative stress induced by acrylamide evaluated by plasma concentration of certain biomarkers	126
4.5.5. The effects of wine polyphenols on oxidative stress induced by acrylamide in the liver	127
4.6. Conclusions	130
5. General conclusions	131
6. Originality and innovative contributions of the thesis	133
REFERENCES	135

KEYWORDS: Romanian wines, polyphenols, flavan-3-ols, flavonols, anthocyanins, stilbenes, *in vitro* antioxidant activity, HPLC-DAD-MS, wines quality and authenticity, FT-MIR spectroscopy, principal component analysis, oxidative stress, acrylamide, *in vivo* antioxidant potential

Introduction

During the last years, much attention was paid to food antioxidants and their association with multiple health benefits, many of these studies focusing on dietary phenols. Red wine is an excellent source of phenolic compounds and may contain 1000-4000 mg/L of polyphenols, with different biological activities, which are attributed mainly to their strong antioxidant and antiradical activities. The antioxidant activity is currently considered to be one of the most important characteristics of wines and is associated with the polyphenolic content.

With regard to regular consumption of red wine, it was hypothesized that it would be the most likely cause for the phenomenon known as the "French paradox". Most researchers have studied and reported activities of red wine, since it contains more phenolic compounds than white wine, due to its mode of fermentation. However, recent epidemiological studies, as well as *in vitro* studies, have suggested that white wine may also protect against cardiovascular diseases similarly to red wine, having a significant capacity to inhibit platelet aggregation *in vitro* and to increase the expression of cardioprotective proteins. However, when red wines are regarded as functional foods, it is necessary to pay attention to some critical constraints such as taste factors, the large variation in total phenolic content and the correlation between *in vitro* and *in vivo* functionality.

In this respect, the present work includes a comprehensive study on detailed phenolic composition and antioxidant activity of local wines, making comparisons between white, rosé and red wines and, also, between wines from different geographical regions of Romania, phenolic profiles of wines serving as valuable tools for distinguishing varieties of wines. Further, the quality and authenticity of the wines have been evaluated using the Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) method in combination with multivariate data analysis, to determine the content of phenolic derivatives, carbohydrates, amino acids and organic acids in various wines, as markers for quality and authenticity. Finally, were tested the *in vivo* protective effects of polyphenols from indigenous wines, consecutive regular consumption of these wines, on oxidative stress induced in rats.

Study 1. Phenolic profile and antioxidant activity of Romanian wines, originating from six native grape varieties

Introduction

The consumption of wine is a common and ancient practice in Romania, our country being one of the main producers and consumers of wine, on the sixth place in EU in terms of the quantity of wine produced, after Italy, France, Spain, Portugal and Germany. Although Romanian wines have several particularities which derive from the fact that they are produced with indigenous grape varieties, which can not be found elsewhere in the world, few data on their phenolic composition can be found currently, except for some parameters, such as total phenolic content or the content of certain individual phenols, such as resveratrol. From what we know, no data are available regarding the content of individual non-volatile phenolic compounds in wines from Romania, nor regarding the *in vitro* antioxidant activity of these wines.

The chemical composition of wines underlies their quality and authenticity. Polyphenolic profile of a variety largely reflects its genetic potential and, therefore, can be used as a tool to discriminate between different varieties. In this respect, we analyzed the chemical compositions of wines obtained from indigenous grape varieties, Fetească Albă (FA), Fetească Regală (FR), Băbească Rose (BR), Busuioacă de Bohotin (BB), Băbească Neagră (BN), Fetească Neagră (FN), and compared them with those of international varieties. The types of wines were produced from grape varieties grown in six major wine regions of Romania.

Aims: (i) characterization of certain samples of wines marketed in Romania, in terms of their chemical composition by high performance liquid chromatography (HPLC); (ii) determination of total polyphenol

content of these wines; (iii) determination of antioxidant activity of investigated wines; (iv) evaluation of potential correlations between total polyphenol content and antioxidant activity of studied red, rosé and white wines.

Materials and methods

A total of fifteen samples of Romanian wines - red, rosé and white - were used in this study. Identification and quantification of phenolic compounds in wines was performed using HPLC-DAD-ESI(+)-MS technique. The total polyphenol content (TPC) was determined by spectrophotometry, using the Folin-Ciocalteu (FC) reagent and gallic acid as a reference standard. The antioxidant activity of wines was determined spectrophotometrically by assessing the DPPH radical-scavenging activity assay, using Trolox as a reference standard.

Results and discussion

Profile and phenolic composition of the wines analyzed by HPLC-DAD-ESI (+) MS

The present study investigated the presence in Romanian wines of phenolic compounds belonging to the two classes of compounds, flavonoids (flavan-3-ols, flavonols and anthocyanins) and non-flavonoids (stilbenes) and allowed the identification and quantification of a total of 38 phenolic compounds, glycosides and aglycones, belonging to these classes. The results showed higher concentrations of flavonoid compounds than of non-flavonoids in all analyzed wines.

Flavan-3-ols. Three flavan-3-ol monomers were found in the studied wines: (+)-catechin, epicatechin gallate and galocatechin. In almost all samples catechin was the most abundant flavan-3-ol monomer, independently of the wine type or the aging period. The great variation obtained for the concentrations of individual flavan-3-ols, both between the three types of wines (white, rosé and red), as well as between the red wines, can be attributed to the grape cultivar, climate characteristics and different vinification techniques. Regarding the total flavanol content, large variations between red wine samples were registered, according to grape variety from which they come, wine samples obtained from FN variety having a higher content of total flavanols than wines made from BN variety.

Stilbenes. In all analyzed wines, six stilbenes were found: five different forms of resveratrol-monomer stilbenes (*trans*-resveratrol, *trans*-piceid, resveratrol-5-O-glucoside, piceatannol, pterostilbene) and one form of resveratrol-dimer (pallidol). The red wines from Dealurile Moldovei wine region (BN_{Panciu 2011}, FN_{Panciu 2011}, BN_{Husi 2009} and FN_{Cotesti 2008}) had higher amounts of *trans*-resveratrol than red wines from other Romanian wine regions, independently of the grape cultivar or the aging period, these differences being related to vinification process (which influences the extraction and diffusion of phenolics from the grape to the wine) as well environmental factors (soil, geographical origin and climatic conditions). Lower concentrations of piceid, compared to those of resveratrol, can be explained by the hydrolysis of glycosylated forms (piceid) present in wine to aglycone form (resveratrol), during wine aging. Also, the values obtained for *trans*-piceatannol concentrations were lower than those measured for *trans*-resveratrol. The levels of total stilbenes showed significant differences according to grape cultivar, winemaking region and vintage: the red wine FN_{Tohani 2010} presented the highest content of stilbenes (20.20 mg/L) and white wine FR_{Jidvei 2011} the lowest content (2.37 mg/L), concentrations in the other analysed samples ranging between 4.69-17.69 mg/L for red wines, 6.87-7.15 mg/L for rosé wines, and 2.37-5.86 mg/L for white wines.

Flavonols. Seventeen flavonols were identified and quantified in Romanian wines, including twelve original grape flavonol O-glycosides (3-O-glucoside, 3-O-galactoside and 3-O-glucuronide of quercetin, 3-O-glucosides and 3-O-galactosides of isorhamnetin and myricetin, 3-O-glucosides and 3-O-(6-acetyl)-glucosides of laricitrin and syringetin, together with kaempferol-3-O-glucoside) and five free flavonol aglycones released by hydrolysis in the wine (myricetin, quercetin, isorhamnetin, laricitrin, kaempferol). Regarding the group of myricetin derivatives, none of the types of white wine contained myricetin aglycone or myricetin-3-O-galactoside, and of the rosé wines, in BR_{Panciu 2012} myricetin aglycone was not

found. Among derivatives of quercetin, only quercetin-3-O-galactoside and quercetin-3-O-glucuronide were detected and quantified in all the fifteen wine samples. Quercetin-3-O-glucoside was not detected in the FR_{Recas 2012} white wine, while the quercetin aglycone was not found in any of the white and rosé wine assortments. These results confirmed that the rates of hydrolysis of the flavonol glycosides in wine were different, according to the type of flavonol aglycone and also with the nature of the glycoside moiety. The isorhamnetin derivatives dominated the flavonol profiles in all white and rosé wines, and also in seven of the nine red wines investigated. For the other two red wine samples, the syringetin derivatives were dominant in the FN_{Ceptura 2012} wine and the kaempferol derivatives in the FN_{Tohani 2010} wine. The concentrations of the flavonol O-glycosides found in all wines were higher than for flavonol aglycones since the conjugates are more stable than the free forms. All wine samples showed high levels of flavonols, decreasing from red wines (142.98-249.08 mg/L) to white wines (78.02-106.03 mg/L) and rosé wines (57.18-75.13 mg/L). Our results showed a variability that can be explained by several factors like the grape cultivar, the degree of grape ripening, the winemaking process and the aging period. Also, the increased biosynthesis of polyphenols, especially flavonols, is highly influenced by sunlight exposure and temperature, so the wines made from grapes which are grown in warmer, sunnier areas had a higher level of flavonols.

Anthocyanins. A number of twelve anthocyanins were identified in the analyzed red wines, while in rosé wines, considering their small content, they could not be quantified. The anthocyanins identified were monoglucosides and, respectively, monoglucoside derivatives of five anthocyanidins: cyanidin, petunidin, delphinidin, peonidin and malvidin, and derivatives were 6-O-acetyl and 6-O-coumaryl. It was observed that the anthocyanin profiles and composition of the wines were not similar; therefore, the vineyard location produced selective effects on individual anthocyanins, even in the case of the wines from the same grape variety. Delphinidin forms of the anthocyanins were the most abundant class of monomeric anthocyanins, followed by malvidin, peonidin, petunidin and cyanidin. Among the non-acylated anthocyanins, malvidin-3-O-glucoside was the only compound found in all red wine samples, while the acylated anthocyanins consisting of five acetylated anthocyanins and two coumaryl derivatives of anthocyanins, were quantified in all red wine samples, having a better stability and solubility than the non-acylated anthocyanins. Regarding the total concentration of monomeric anthocyanins, for BN wine samples this was lower than for FN wines.

Principal component analysis (PCA)

Multivariate data analysis has resulted in the identification of three main groups: the first included white wines, the second rosé ones and the third included red wines. The first group partially overlapped the second one for two white wines but, overall, wines were obviously discriminated along the first axis (PC1), depending on the types of wine they belong (white, rosé or red). The results obtained by PCA demonstrate that the differences between samples are due to varietal variability and to the wine colour, but in terms of geographical region it is more difficult to discriminate the samples considering only the phenolic composition.

Total polyphenol content

The results obtained in determining TPC of Romanian wines analyzed by FC method showed variations between white, rosé and red wine samples. Total polyphenol content of red wines was up to 10 times higher compared to rosé and white ones. These differences may be also the result of a better phenolics' extraction from grape skin and seed contact time, fermentation conditions and temperature for red wines, as opposed to white ones. Also, among the red wines significant differences between the TPC values were obtained, the phenolic content of the FN_{Tohani 2010} wine (2359 mg GAE/L) being of 3 times higher than that of the BN_{Panciu2011} wine (801 mg GAE/L). TPC varied between different wine samples, according to grape variety, environmental factors in the vineyard, the wine processing techniques, soil and atmospheric conditions during ripening, aging process and berry maturation.

Total antioxidant activity

The values obtained for the antioxidant activity of wines determined by DPPH• free radical method showed significant differences between the three types of analyzed wine, white, rosé and red. Thus, the ability to inhibit free radical DPPH• of red wine samples was significantly higher, compared to the one of white and rosé wines. The strongest antioxidant activity was found in the red wine FN_{Tohani 2010}, having the highest content of phenolics, while the lowest activity was obtained in the white wine FA_{Cotesti 2011}, with the lowest content of phenolics. The highest phenolic content of red wines contributed to their increased antioxidant activity in comparison to rosé and white wine.

Correlations between total phenolic content and total antioxidant activity

Our results showed that the antioxidant activity of wines has not been influenced by TPC, since wines having a highest TPC did not always show the highest values for antioxidant activity. Therefore, we can conclude that the antioxidant activity of wines is more related to the type of individual phenolic compounds found in wines, than to the total phenolic content.

Conclusions

This study represents the first phytochemical investigation of phenolic components from 15 different Romanian wines, produced in ten viticulture centres, from six indigenous grape cultivars. A total of 38 individual phenolic derivatives were identified and quantified in red, rosé and white wine samples by HPLC-DAD-ESI(+)MS analysis. The results obtained revealed that the red wine samples were characterized by a higher phytochemical concentration and a higher antioxidant capacity than the white and rosé wine samples.

By Principal Component Analysis, significant discriminations between samples were noticed, due to varietal variability and to the wine colour, flavan-3-ols, e.g. catechin, epicatechin and gallic acid being mainly responsible for the discriminations among clustered wine samples.

Total and individual phenolic compounds content and antioxidant activity measured as radical scavenging activity were comparable to those of wines produced from international grape cultivars. The antioxidant activity of wines seems to be more related to the type of individual phenolic compounds, than to the total phenolic content and the antioxidant activity to be mainly due to the flavan-3-ols.

The results confirmed that the tested Romanian wines represent a good source of antioxidants and, therefore, a moderate consumption may have beneficial influence on human health.

Study 2. Evaluation of Different Romanian Wines Quality and Authenticity Using FT-MIR Spectroscopy Coupled with Multivariate Data Analysis

Introduction

The quality and authenticity of the varietal origin of grapes and wines is of great interest to both wine industry and consumers. The Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) technique, in combination with chemometrics, is a fast and reproducible technique for identifying the authenticity and adulteration of different food and beverage products.

In the present work, the Fourier Transform mid-infrared (FT-MIR) spectroscopy was applied to characterize 15 different Romanian wines (white, rosé and red), obtained from different authentic, origin-denominated cultivars, found in different Romanian regions. The wines were investigated by attenuated total reflectance (ATR) and the most important components (phenolics, carbohydrates, aminoacids and organic acids) were localized in specific fingerprint regions of the spectra. Based on the differences between the FT-MIR spectra, by multivariate data analysis (Principal component analysis) were identified the specific discrimination factors useful to authenticate the biological (cultivar) and regional origin, as well their sweetness index.

Aims: determining the quality and authenticity of Romanian wines, using FT-IR spectroscopy coupled with PCA chemometric method.

Materials and methods

Fifteen Romanian wines, including white ($n = 4$), rosé ($n = 2$) and red ($n = 9$), of different sweetness indexes (5 samples dry, 7 samples half-dry and 3 samples half-sweet) were investigated. The FT-IR spectra were obtained with a Shimadzu IR Prestige-21 spectrometer, in the range of wave numbers 600-3500 cm^{-1} , at a spectral resolution of 4 cm^{-1} . For each spectrum were mediated 64 scans. Advanced chemometrics was applied to discriminate between different wine samples, based on their colour, content of phenolic derivatives, aminoacids and organic acids, as well as carbohydrates.

Results and discussion

FT-MIR spectral fingerprinting of individual wine samples

In all samples, similar spectral features were generally obtained, but with specific quantitative modifications in the fingerprint region (1800-600 cm^{-1}). The characteristic peaks identified in the spectral fingerprint area suggested the presence in wine samples of the constituent compounds: water, ethanol, aldehydes, glycerol, aminoacids, esters, minerals, polyphenols, sugars and organic acids. Comparing the shapes of spectra, four different regions (1-4) were identified: region 600-940 cm^{-1} (1) corresponding to phenolic derivatives (including esters), region 970-1100 cm^{-1} (2) to carbohydrates (glucose, fructose and oligosaccharides, mainly saccharose), region 1600-1716 cm^{-1} (3) to free aminoacids, peptides and organic acids and region 2800-3000 cm^{-1} (4) corresponding to polyols (mainly glycerol). Regions 1-4 were able to demonstrate specific differences between samples, related to the colour of the three types of wine (white, rosé and red), and their sweetness, depending on the sugar content (dry, half-dry and half-sweet).

Identification of specific functional groups and molecules in wines, depending on their colour and sweetness

Generally, the range 600-1800 cm^{-1} was considered as “fingerprint region”, useful to differentiate wines according to their sweetness index (dry vs half-dry and half-sweet). One can notice that in region (1), the absorptions are determined mainly by the polyphenols, region (2) was specific to carbohydrates, mainly glucose (1033 cm^{-1}), but also fructose and saccharose (1100 cm^{-1}), region (3) was specific to aminoacids (1602-1608 cm^{-1}) and organic acids (1700 cm^{-1}).

The values of peak intensities at 1033, 1100, 1600, 1700 cm^{-1} were used as quantitative markers of differences between the individual wines and wine types (based on colour and sweetness index). The ratios 1033/1100 cm^{-1} and 1600/1700 cm^{-1} were also used to characterize quantitatively the sweetness claimed on the label of these wines (dry, half-dry and half-sweet).

The difference between FT-IR fingerprints of wines consisted in the different ratio of the intensity of specific bands identified in wine samples. Thus, the band due to glucose, at 1033 cm^{-1} had a higher intensity for the half-sweet wines than for the dry wines, this being explained by the presence of glucose in greater amount in half-sweet wines. Also, the ratio of peaks intensity corresponding to glucose, respectively fructose + sucrose (1033/1100 cm^{-1}), was higher for half-sweet wines when compared to dry and half-dry wines.

Regarding the acidity of wines, it was observed that the band at 1700 cm^{-1} , corresponding to organic acids, had the highest intensity for white wines, followed by rosé wines, the lowest peaks intensity being obtained for the red wines. This indicates that the acidity of wines decreases in the order white wines > rosé wines > red wines. Within the red wines, samples no. 8, 10, 13 and 14 showed a high intensity of peaks corresponding to organic acids, compared to the rest of red wines, indicating a similar acidity of these samples with that of the rosé wines.

Multivariate Data Analysis by Principal Component Analysis

For the whole fingerprint region (600-1800 cm^{-1}), the first two principal components, PC1 and PC2, explained 90% of the whole variability of the wine samples and showed a good similarity for white wines and, also, for rosé wines, red wines being more heterogeneous in the composition and spread in the upper and the lower part of the plot, not clustered in a specific group. Nevertheless, the red half-sweet wines were close to the rosé wines, which proved to be superior in sweetness.

For the region 970-1100 cm^{-1} , specific to carbohydrates, and for the region 1600-1716 cm^{-1} , specific to aminoacids and organic acids, the first two components, PC1 and PC2 together, explained a large percentage of 97% of the whole variability of wine samples, suggesting a good clustering based on their colour, sweetness index and acidity.

For the region 750-940 cm^{-1} , specific to phenolic derivatives, although the variance explained was high (98%), a weaker clustering of wines based on their different colours was obtained. In this case, the wines were discriminated along the axis PC2, depending on the type of wine to which they belong (white, rosé or red), the three groups being partially overlapped with each other, such overlaps being due to the closer relationship between some of wines which come from the same vineyard or the same manufacturer. Multivariate data analysis showed that all four components of wines (phenolics, carbohydrates, aminoacids, organic acids) which contribute to the colour, sweetness and acidity, are responsible for the good, significant clustering of these wines.

Conclusions

This study demonstrated that mid-infrared spectroscopy, coupled with principal component analysis, represents a very powerful tool for distinguishing groups that have very similar properties, but have consistent overall differences, and might be used as a technique for the discrimination between different red, rosé and white wine varieties. Therefore, the ATR-FT-MIR analysis proved to be a very fast, cheap and efficient tool to evaluate the quality and authenticity of wines, and to discriminate each wine category, based on their colour and sweetness, as consequence of their biological specificity (cultivar).

The use of this fast technique can offer benefits for the wine industry by being a robust rapid screening tool for the discrimination of different types of wine, based on their colour and sweetness, and also being capable of measuring wine quality and assuring consumers of the quality of the final product to be enjoyed.

Study 3. The protective effects of wine polyphenols on oxidative stress and hepatotoxicity induced by the administration of acrylamide in rats

Introduction

Assessment of quality markers and *in vitro* antioxidant activity of Romanian wines was a useful starting point for investigating their *in vivo* antioxidant potential. Therefore, this study was designed to evaluate the protective antioxidant effects of biologically active substances from wine against oxidative stress and liver toxicity induced experimentally by acrylamide (ACR) in Wistar rats.

Since at present there are insufficient studies carried out on chronic models to demonstrate the relationship between the bioavailability of the phenolic compounds and their antioxidant effects, this experiment intended to evaluate the relationship between *in vitro* and *in vivo* functionality of wines, namely, to what extent *in vivo* antioxidant response magnitude is proportional to *in vitro* antioxidant activity of wines.

Aims: (i) investigation of *in vivo* antioxidant effect of two wine samples, with high, respectively, low *in vitro* antioxidant activity, on oxidative stress induced by ACR, by means of biomarkers determined in plasma and liver tissue; (ii) evaluation of potential protective effects of polyphenols from these wine samples, on the hepatocellular lesions produced by ACR in rats, by determining liver enzymes; (iii)

comparative study of histopathological alterations occurred in rats treated with ACR after dietary supplementation with two different wine samples.

Materials and methods

The two wine samples used in this study are: the red wine Fetească Neagră (12.5% ethanol (v/v)), with a CTP value of 2359 mg GAE/L and an *in vitro* antioxidant activity of 9.84 mM TE/L, and the white wine Fetească Regală (12.5% ethanol (v/v)), with a CTP value of 245 mg GAE/L and an *in vitro* antioxidant activity of 0.93 mM TE/L.

It has been used a collectivity of 60 white rats, Wistar strain, males, with initial body weight of 150 ± 14 g. All animal procedures and treatments in this study were in compliance with the general guidelines for the use and care of animals used for scientific purposes and approved by the Ethics Committee of the "Iuliu Hațieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca (Romania) (protocol number 219/11.06.2014). The animals were divided randomly into six groups, each group consisting of ten animals, which, for 28 days, received daily by intragastric gavage the treatments established according to the experimental protocol described in the thesis.

Transaminases, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), were determined in plasma samples by spectrophotometric assays. Determination of the level of lipid peroxidation by quantifying malondialdehyde (MDA) in rat plasma was performed by UPLC-PDA technique. Determination of plasma levels of reduced and total glutathione (GSH) was performed by UPLC-FLD technique. Samples of liver tissue taken after rats' sacrifice subsequently served for histopathological examination of liver tissue and for determination, by spectrophotometric methods, of the following biomarkers of oxidative stress: MDA, reduced GSH and activity of antioxidant enzymes (superoxid dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx)).

Results and discussion

General toxicity: the evolution of animal body weight, absolute and relative liver weight

Hepatotoxicity caused by ACR was translated into an increased liver size in groups treated with ACR, increase that could be explained by liver hepatocyte proliferation as a result of chemically induced hyperplasia, increase of the volume of individual hepatocytes, or simply may be due to infiltration with lympho-histiocytic cells. The results suggest that co-administration of white or red wine to ACR-treated rats did not cause a change in the values of body weight, relative and absolute liver weight in the direction of the values obtained for the control group (C).

Histopathological examination of rat liver

Histopathology of the liver for group C showed a similar histo architectonic with that of groups that received white wine (WW) and, respectively, red wine (RW), morphological modifications in these 3 groups being discrete, consecutive to subacute alcohol consumption. The images obtained following histopathological evaluation showed that animals in the groups treated with ACR presented slight morphological modifications, the differences between the three groups being minor. The most affected were the positive control (PC) group and the white wine+acrylamide (WW+ACR) group. The absence of an evident liver protective effect of red wine may be the consequence of a too short duration of the experimental study, subacute administration over a period of four weeks, while liver protective effects of polyphenols have been reported after consumption of red wine over longer periods of time.

Biochemical parameters of liver damage

The evolution of ALT and AST showed significant increases ($p < 0.05$) of the activities of these enzymes in the case of the group treated with ACR, compared with C group, suggesting hepatocyte membrane permeabilization and migration of ALT and AST in the intercellular space. The results for AST indicated that red wine polyphenols have conferred a protective effect against liver toxicity of acrylamide in the group treated with red wine+acrylamide (RW+ACR). However, this protection was not confirmed

by the values obtained for ALT in the RW+ACR group compared to PC group, in this case being observed just a tendency of normalization of ALT in the direction of the values obtained for C group. The lack of an evident protection may be due to dietary supplementation with wine over a too short period, the effects of polyphenols being visible only after chronic administration of wine. The results obtained for transaminases are in accordance with the histopathological studies of liver tissue.

The effects of wine polyphenols on oxidative stress induced by acrylamide evaluated by plasma concentration of certain biomarkers

The data obtained in this study showed that ACR increased lipid peroxidation, expressed by increased plasma levels of MDA. The decrease of MDA plasma concentration observed in the study in WW+ACR and RW+ACR groups, suggests that the whole process of lipid peroxidation was reduced by regular supplementation of the diet with wine.

Wines' antioxidant effects have been demonstrated by the results obtained for the two parameters, reduced GSH and reduced/total GSH ratio in plasma of the animals. Thus, a significant increase ($p < 0.05$) of reduced GSH plasma levels was evident both in the WW+ACR group, as well as the RW+ACR group, compared with PC group, while the reduced/total GSH ratio was significantly increased ($p < 0.05$) only in the RW+ACR group. This demonstrated that wine intake has resulted in a protective effect due to phenolic antioxidants present in both types of wine, but the protective effect was significantly more pronounced for the red wine, having a higher phenolic content compared to the white wine.

The effects of wine polyphenols on oxidative stress induced by acrylamide in the liver

The effects of wine polyphenols on lipid peroxidation and reduced glutathione in the liver. In this study, the reduction in GSH hepatic tissue levels and the increase of lipid peroxidation degree in the ACR-treated group compared to the control group, respectively, can be explained by the reaction between ACR and GSH, reaction which causes depletion of GSH and the increase of lipid peroxidation. At the same time, after the administration of wines, the reduction of MDA levels and the increase of GSH levels were observed, due to the protective antioxidant effects of the constituent polyphenols. Thus, dietary supplementation both with white wine and red wine, in ACR-treated rats, significantly reduced ($p < 0.05$) hepatic MDA level in the two groups, compared to the group treated only with ACR. These findings demonstrate that oxidative lesions induced by ACR in the liver were ameliorated both by white wine treatment, but especially by red wine treatment. Unlike the results obtained for MDA, where white wine supplementation conferred a protective effect against ACR, in case of hepatic GSH the effect of white wine supplementation was weak, without providing protection by significantly increasing of reduced GSH level.

The effects of wine polyphenols on liver antioxidant enzyme activities. Low levels of enzymatic activities of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase were recorded in the liver tissues of ACR-treated group, compared to C group, suggesting acute injury caused by ACR. Damaging effects of ACR in the liver were reduced with the administration of wines, a change in the level of CAT and SOD to normal levels being observed, depending on the type of the wine administered.

Statistical analysis revealed that the type of wine administered has influenced the activity of SOD and CAT, but showed no significant effect for GPx. Thus, dietary supplementation with red wine in the ACR-treated group caused a significant increase ($p < 0.05$) of SOD and CAT enzymatic activities, compared to the group treated only with ACR, whereas dietary supplementation with white wine did not produce significant differences in the activities of these enzymes. The amelioration effects of red wine were more pronounced than those caused by white wine, due to its higher polyphenolic content compared to that of white wine. Regarding GPx activity, dietary supplementation with white or red wine, has not produced significant differences between groups treated with ACR, suggesting that in this case none of the two types of wine exerted a protective effect against ACR.

Conclusions

In the present study, acrylamide has caused disturbances of oxidative status and enzyme activities, the results obtained for biochemical parameters of liver damage, histopathological examination of liver tissue and oxidative stress parameters studied confirming the efficiency of acrylamide in generating oxidative stress.

Our results have indicated that red wine, having a total phenolic content and *in vitro* antioxidant activity higher than those of white wine, was able to protect the liver against oxidative stress, even during subacute exposure to ethanol, statistically significant effects being observed both on liver and plasma evaluated markers. Superior protective effects of red wine were correlated to its non-alcoholic components.

Biochemical parameters presented an improvement only for AST levels and histopathological examination revealed only a moderate attenuation of morphological modifications, consecutively dietary supplementation with red wine for 4 weeks, most likely due to a too short administration period.

The main objective of this study was achieved, since our experimental groups were able to demonstrate a variation in the intensity of the *in vivo* protective effects, depending on the types of wine administered, so that the protective effects in an oxidative stress model induced by acrylamide were more pronounced at higher doses of polyphenols, as was the case for red wine.

General conclusions

The research carried out in order to characterize wines and to study their *in vitro* and *in vivo* antioxidant potential led to the following conclusions:

- HPLC-DAD-ESI(+)MS analysis has allowed the complete phenolic profiling and has provided overall composition of wines, offering valuable information on the main individual phenolic compounds belonging to the classes of flavonoid compounds (flavan-3-ols, flavonols and anthocyanins) and non-flavonoids (stilbenes).
- Comparative assessment of individual phenolic content, respectively, total phenolic content and antioxidant activity of the fifteen analyzed wine samples showed variations of the values obtained both between the three types of wines, white, rosé and red, as well as between different samples of the same wine sort, thus: red wines showed higher antioxidant capacity, and also total phenolic content levels and concentrations of individual phenolic compounds significantly higher, compared to white and rosé wines; among red wine samples, there have been variations of the antioxidant activity and phenolic composition, according to the grape variety and geographical origin.
- The correlations between total phenolic content and antioxidant activity of wines showed that the latter was influenced more by the profile of individual phenolic compounds and total polyphenol content can not be considered a major criterion for estimating antioxidant capacity.
- FT-IR spectroscopic analysis coupled with multivariate data analysis allowed the characterization and comparison of the fifteen wine samples, depending to their colour, index sweetness and acidity, based on the specific fingerprints of the four characteristic absorption regions, corresponding to the main component groups from wine: phenolic derivatives, carbohydrates, amino acids and organic acids.
- The qualitative evaluation of each component category made possible the discrimination of each wine category, from red, to rosé and white - in terms of colour, and from dry, to half-dry and half-sweet in terms of taste/sweetness, demonstrating that ATR-FT-MIR analysis is a very fast, cheap and efficient tool to evaluate the quality and authenticity of wines.
- The evaluation of oxidative stress biomarkers, biochemical parameters of liver damage and histopathological modifications in rats showed disturbances of oxidative status and enzyme activities and

morphological modifications in the liver, consecutive subacute intoxication with low doses of acrylamide, confirming the efficiency of acrylamide use in generating oxidative stress.

- The administration of acrylamide, in combination with simultaneous supplementation of the rats' diet with white wine or red wine, showed a beneficial intervention of wine polyphenols by normalizing the biomarkers evaluated in the liver and in plasma and by reducing hepatic morphological modifications in case of supplementation with red wine, the protective effects of red wine in an oxidative stress model induced by acrylamide being significantly more pronounced than those of white wine.
- *In vivo* antioxidant potential of wines was different, depending on the types of wine administered, the superior protection conferred by red wine, compared to white wine, being due to the phenolic content and *in vitro* antioxidant activity of red wine, approximately ten times higher than those of white wine.

Originality and innovative contributions of the thesis

The originality note of the thesis is supported by the study of exclusive Romanian wines, made from indigenous grape varieties. The study of wine's phenolic composition is a topic that has attracted great interest in recent years due to the antioxidant properties of wine polyphenols and the numerous health benefits attributed to these compounds.

The present paper presents the first phytochemical research of phenolic components from fifteen Romanian wines produced in different viticultural centers in Romania, from six indigenous grape varieties. This research has achieved for the first time a characterization of white, rosé and red wine varieties from Romania, by an extensive and comparative analysis of the constituent compounds belonging to the main classes and subclasses of phenolic compounds and of each category of wine, on the basis of their colour and their sweetness index, as a result of their biological specificity.

Whereas so far, no research regarding phenolic compositional characteristics and antioxidant parameters of wines produced in Romania from the varieties studied in this work, have been published and national and international research has focused mainly on red wines, this paper brings new information on the phytochemical profile, not at all negligible, of the three wine assortments and their *in vitro* antioxidant potential. The paper also presents the first research that evaluates the *in vivo* antioxidant potential of two different types of Romanian wine and the relationship between *in vitro* and *in vivo* functionality of wines, providing important data regarding the protective effects of bioactive compounds in these wines on oxidative stress.

Finally, this thesis provides valuable information concerning the nutraceutical value of tested Romanian wines, which proved to be an important source of antioxidants. Given the fact that wine is a key component of the Mediterranean diet, which is a model diet to prevent more serious illnesses, such information regarding the benefits of Romanian wine polyphenols could be of great interest to human nutrition, serving to encourage the development of healthier consumer habits and the adoption of a healthy lifestyle.

Selective references

3. Paixão N, Perestrelo R, Marques JC, Câmara JS. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem.* 2007; 105:204-214.
11. Guerrero RF, García-Parrilla MC, Puertas B, Cantos-Villar E. Wine, resveratrol and health: a review. *Nat Prod Commun.* 2009; 4(5):635-658.
17. Banc R, Socaciu C, Miere D, Filip L, Cozma A, Stanciu O, Loghin F. Benefits of wine polyphenols on human health: A review. *Bulletin UASVM Food Science and Technology.* 2014; 71(2):79-87.
66. Lorrain B, Ky I, Pechamat L, Teissedre PL. Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines, and extracts. *Molecules.* 2013; 18:1076-1100.
193. Jiang B, Zhang ZW. Comparison on phenolic compounds and antioxidant properties of Cabernet Sauvignon and Merlot wines from four wine grape-growing regions in China. *Molecules.* 2012; 17:8804-8821.

237. Banc R, Loghin F, Miere D, Fetea F, Socaciu C. Romanian wines quality and authenticity using FT-MIR spectroscopy coupled with multivariate data analysis. *Not Bot Horti Agrobi.* 2014; DOI:10.15835/nbha4229674.
282. Todașcă MC, Chira N, Deleanu C, Roșca S. Romanian wine study using IR spectroscopy in comparison with ¹H-NMR. *UPB Sci Bull, Series B.* 2007; 69(4):1-8.
284. Socaciu C, Ranga F, Fetea F, Leopold L, Dulf F, Parlog R. Complementary advanced techniques applied for plant and food authentication. *Czech J Food Sci.* 2009b; 27:S70-S75.
292. Gris EF, Mattivi F, Ferreira EA, Vrhovsek U, Filho DW, Pedrosa RC, Bordignon-Luiz MT. Phenolic profile and effect of regular consumption of Brazilian red wines on in vivo antioxidant activity. *J Food Compos Anal.* 2013;31:31-40.
330. Uzma N, Kumar BS, Anees S. Red wine ameliorates CCl₄ – induced acute liver injury in rats. *Australian Journal of Biomedical Science.* 2011; 1(1):1-7.
332. Alturfan AA, Tozan-Beceran A, Sehirli AO, Demiralp E, Sener G, Omurtag GZ. Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Mol Biol Rep.* 2012; 39(4):4589-4596.
336. Macedo LF, Rogero MM, Guimarães JP, Granato D, Lobato LP, Castro IA. Effect of red wines with different in vitro antioxidant activity on oxidative stress of high-fat diet rats. *Food Chem.* 2013; 137(1-4):122-129.