



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00502

(22) Data de depozit: 18.08.2022

(41) Data publicării cererii:  
28.02.2024 BOPI nr. 2/2024

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI  
PATOLOGIE CELULARĂ "NICOLAE  
SIMIONESCU" BUCUREȘTI,  
STR. B.P. HAȘDEU NR. 8, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• HOFIGAL EXPORT IMPORT S.A.,  
INTRAREA SERELOR, NR.3, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• DELEANU MARIANA, ȘOS.PANTELIMON,  
NR.354, BL.2, SC.4, ET.4, AP.135,  
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;  
• TOMA LAURA, STR.DRUMUL CÂMPENI,  
NR.46, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;  
• SANDA GABRIELA MARIA,  
STR.OLTULUI, NR.7C, BL.B3, ET.3, AP.13,  
BUFTEA, IF, RO;

• NICULESCU LOREDAN ȘTEFAN,  
STR.VALEA LUNGĂ, NR.15, BL.19, SC.1,  
AP.2, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• BARBĂLATĂ TEODORA,  
STR.LIVIU REBREANU, NR.18, BL.A5,  
SC.5, AP.59, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• SUCIU ALEXANDRU, STR. ANTON PANN  
NR. 11, MEDIAȘ, SB, RO;  
• ALEXANDRU GEORGETA,  
STR. IZVORUL RECE NR.1, BL.M1/1,  
SC.10, AP.446, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• CRIȘAN IULIANA, ALEEA FETEȘTI  
NR.16, BL.M9, SC.G, ET.2, AP.97,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• POPESCU MARIANA, STR.VIIOR II NR.5,  
PANTELIMON, IF, RO;  
• STANCU CAMELIA SORINA,  
STR.SG.MAJ.ION NEDELEANU, NR.9,  
BL.P61, SC.2, AP.33, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) FITOZOMI CU COMPUȘI BIOLOGIC ACTIVI DIN RIZOMI  
DE GHIMBIR ȘI FRUCTE DE MĂCEȘ  
CU BIODISPONIBILITATE CRESCUTĂ ȘI PROCEDEU  
DE OBȚINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor complexe moleculare fito-fosfolipidice cu proprietăți antioxidante și anti-inflamatoare. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: preparare și caracterizare a extractului hidroalcoolic de ghimbir (*Zingiber Officinale*), respectiv, a extractului hidroalcoolic de măceșe (*Rosa canina*), combinarea extractelor în rapoarte masice de 0,5:0,5, solubilizare în etanol absolut, la 60° C, sub agitare magnetică până la obținerea unei suspensii omogene, adăugarea sub refluxare și agitare de fosfatidilcolină solubilizată în

etanol în raport masic cu cele două extracte de 0,5:0,5:1 cu menținerea în reacție timp de 2 h la 60°C, evaporarea etanolului, hidratarea compusului și ajustarea dimensiunii particulelor fito-fosfolipidice prin sonicare, rezultând fitozomi ca formulări de extracte din rizomi de ghimbir, respectiv, fructe de măceș și fosfatidilcolină, în raport masic de 0,5:0,5:1, care conferă o biodisponibilitate crescută cu peste 150% a principiilor active conținute.

Revendicări: 5

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



## FITOZOMI CU COMPUȘI BIOLOGIC ACTIVI DIN RIZOMI DE GHIMBIR ȘI FRUCTE DE MĂCEȘ CU BIODISPONIBILITATE CRESCUTĂ ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE

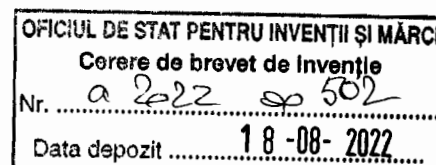
**Prezenta invenție** se referă la un procedeu de obținere a unor fitozomi care conțin principii active din extracte hidroalcoolice liofilizate din rizomi de ghimbir (*Zingiber officinale*) și fructe de măceș (*Rosa canina*), pe care i-am denumit FITOGINROSA, concepuți pentru a crește biodisponibilitatea acestor compuși cu rol antioxidant și anti-inflamator și a diminua pierderile în procesul de absorbție a lor de-a lungul tractului digestiv. Formularea acestor principii active în fitozomi permite administrarea lor pe cale orală și le asigură creșterea proprietăților lor antioxidante și anti-inflamatoare ceea ce conferă aplicabilitate acestor preparate pentru tratamentul a numeroase patologii care apar și se dezvoltă pe seama creșterii stresului oxidativ și a celui inflamator.

### Stadiul actual

Antioxidanții sunt compuși esențiali pentru buna funcționare a organismului, fiind responsabili în principal pentru contracararea speciilor reactive de oxigen (SRO) produse în exces în organism și care sunt dăunătoare celulelor și țesuturilor acestuia. În egală măsură, unele substanțe antioxidante sunt vitale datorită potențialul lor de a regla expresia genică pentru numeroase proteine. Preocuparea pentru găsirea de terapii antioxidante sau anti-inflamatoare eficiente, cu efecte secundare minime, pentru prevenirea sau tratarea diferitelor patologii este în continuă creștere. Numeroase studii au arătat că antioxidanții existenți sunt ineficienți în tratarea multor patologii, iar eșecul lor se datorează parțial utilizării unor doze mari, nocive, de compuși sau unor formulări care nu conferă stabilitate și biodisponibilitate crescută compușilor activi conținuți. Astfel, s-a demonstrat faptul că polifenolii naturali au proprietăți antioxidante și anti-inflamatoare, însă asigurarea unei concentrații eficiente la nivelul organismului este limitată de stabilitatea acestor compuși și de capacitatea de absorbție a lor de către tubul digestiv.

**Produsul acestei invenții** îl constituie o nouă generație de fitozomi care conțin un amestec de substanțe biologice active din extracte hidroalcoolice liofilizate de rizomi de ghimbir (GINex) și fructe de măceș (ROSAex), denumiți FITOGINROSA, cu proprietăți anti-oxidante și anti-inflamatoare crescute.

Rizomii de ghimbir prelucrați în diverse moduri sunt utilizați, în special în Asia și Orientul Mijlociu, drept condimente, suplimente alimentare dar și în medicina tradițională. Au fost identificați peste 400 de compuși diferiți în extractul hidroalcoolic de ghimbir, cei mai mulți fiind



*Stancu*

*Lele*

gingeroli, shogaoli, polifenoli și flavonoide [Mohamed O.I. și colab., 2016]. Gingerolii, compuși majoritari prezenți în rizomii de ghimbir, sunt renumiți pentru contribuția lor benefică pentru sănătatea și nutriția umană. Unele proprietăți medicinale ale ghimbirului, precum atenuarea greței, artritei și durerii, au fost asociate cu gingerolii. Atât gingerolii, cât și shogaolii prezintă o serie de activități biologice, variind de la activitatea antioxidantă, anti-inflamatoare și anti-apoptotică la cea antimicrobiană, anticoagulantă, anticancerigenă sau hipolipemiantă. O atenție deosebită a fost acordată efectului antidiabetic al ghimbirului, fiind descris un mecanism de acțiune al gingerolilor care implică receptorul tranzitoriu de potențial tip canal cationic-V1 în creșterea absorbției de glucoză în mușchi și în inflamație [Srinivasan K., 2017]. Includerea ghimbirului sau a extractelor de ghimbir în formulările nutraceutice ar putea oferi o protecție valoroasă împotriva diabetului, obezității, a tulburărilor cardiace și hepatice [Hosseinzadeh A. și colab., 2017; Mao Q.Q. și colab., 2019]. Totodată, principiile active din ghimbir au fost descrise ca având efecte benefice asupra sistemului nervos și al celui respirator [Mao Q.Q. și colab., 2019]. Au fost descrise însă o serie de efecte adverse ale ghimbirului, precum iritarea tractului digestiv, aritmii cardiace și sângerări datorate interacțiunii cu molecule anticoagulante. Cele mai multe dintre aceste efecte survin datorită utilizării unor supradoze în intenția de a crește efectele benefice ale ghimbirului [Zhu J. și colab., 2018].

Fructele de măceș sunt utilizate în medicina tradițională din întreaga lume pentru tratamentul artritei reumatoide și a osteoartritei, pentru ameliorarea durerii sau reducerea valorilor plasmatică de glucoză și colesterol. Compușii biologic activi din măceșe sunt vitamina C, polifenoli, flavonoide, triterpenoide, fitosteroli și carotenoide și exercită efecte analgezice, antioxidante, anti-inflamatoare și osteoprotectoare [Chrubasik C. și colab., 2006]. Aceste principii active acționează asupra diferitelor molecule-țintă în calea de semnalizare a factorului NF- $\kappa$ B, inhibând molecule pro-inflamatoare precum metaloproteazele matriceale și ciclooxigenaza-2, scăzând producția de citokine și chemokine inflamatorii (factorului de necroză tumorală  $\alpha$  - TNF $\alpha$ , interleukina 1 $\beta$  - IL-1 $\beta$ , interleukina 6 - IL-6) și reducând stresul oxidativ, care în continuare suprează procese inflamatorii [Cheng B.C. și colab., 2016]. Interesul terapeutic pentru fructele de măceș a crescut în ultimii ani, acestea fiind evidențiate ca având efecte benefice în tratamentul unor boli precum hepatotoxicitate, disfuncții renale, afecțiuni ale pielii, boli inflamatorii, artrite, diabet, hiperlipidemie, obezitate sau cancer [Mármol I. și colab., 2017].

Fitozomii pot fi definiți drept complexe între compuși fenolici naturali și fosfolipide. Formarea acestor complexe poate fi dedusă din compararea spectrelor RMN ale complexelor cu cele ale precursorilor puri, compusul (extractul) natural și fosfatidilcolina. Un astfel de complex se obține prin reacția dintre cantități stoechiometrice de fosfatidilcolină și un compus fenolic (din extractul natural) într-un solvent convenabil. Pe baza datelor spectroscopice a fost demonstrat

faptul că principala interacțiune fosfolipid-substrat se datorează formării legăturilor de hidrogen între capul polar al fosfolipidelor (gruparea fosfat și amoniu) și compușii fenolici puri (din extracte naturale). Când sunt hidratați, fitozomii iau forme micelare formându-se structuri asemănătoare lipozomilor. Însă, în fitozomi, principiul activ este ancorat (legat) prin legături de hidrogen de capul polar al substratului fosfolipidic, devenind astfel parte integrantă a membranei, spre deosebire de lipozomi unde este doar încorporat în interiorul veziculelor.

Principiile active din rizomii de ghimbir au făcut obiectul unor patente anterioare și anume: (1) patentul european **EP 2 598 156 B1** descrie o formulă care asociază extracte lipofile de *Echinacea angustifolia* și *Zingiber officinale* și care s-a dovedit a fi utilă în reducerea inflamației și a durerilor periferice și (2) patentul european **EP 2 379 095 B1** descrie alte formulări ale acestorași extracte utile pentru prevenirea și tratamentul refluxului gastroesofagian.

Principiile active din fructele de măceș au fost incluse într-o formulare care face obiectul patentului **EP 2 872 135 B1**. Acesta se referă la un preparat care cuprinde coji de măceșe uscate și măcinate la o anumită dimensiune și vitamina C adăugată suplimentar și la un procedeu pentru obținerea respectivului preparat. De asemenea, se referă la utilizarea preparatului pentru menținerea flexibilității articulațiilor și la reducerea inflamației în special în cazul osteoartritei. Inventatorii au identificat aceste ingrediente bioactive prin analize foarte complexe ca fiind vitamina C, caroteni, flavonoide, acizi triterpenoici și galactolipide.

**Avantajele prezentei invenții** constau în obținerea unor fitozomi, în care fosfatidilcolina se combină cu principiile active vegetale, și anume: gingeroli și shogaoli extrași din rizomii de ghimbir și polifenoli și carotenoide extrase din fructele de măceș, rezultând un produs cu stabilitate și biodisponibilitate crescute, cu proprietăți antioxidante și anti-inflamatoare și care poate fi administrat pe cale orală, fără a prezenta efecte adverse.

Prin utilizarea fitozomilor cu substanțe biologice active naturale obținuți folosind procedeul descris în această invenție se poate interveni în tratamentul de prevenție sau de reversie a patologiilor care apar și evoluează pe seama creșterii stresului oxidativ și a celui inflamator.

Utilizarea prezentei invenții ar contribui la reducerea costurilor de tratament pentru un număr mare de patologii care includ boli metabolice și inflamatorii, precum și la creșterea speranței de viață și a perioadei active a oamenilor, cu consecințe pozitive pentru eficiența muncii și nivelul de trai al populației.

### **Descrierea invenției**

Integritatea structurală și funcțională a oricărei celule se menține printr-un echilibru între nivelurile moleculelor pro și anti-oxidante. Perturbarea acestui echilibru generează o producție excesivă de SRO care depășește apărarea antioxidantă și care generează produși de oxidare ai

acizilor nucleici, acizilor grași și aminoacizilor. Astfel apare stresul oxidativ care declanșează în continuare stresul inflamator, ambele evenimente inducând leziuni celulare [Forrester S.J. și colab., 2018; Pisoschi A.M. și colab., 2021]. Printre markerii circulanți de stres inflamator existenți *in vivo* se numără TNF $\alpha$  și IL-1 $\beta$  [Qu X. și colab., 2018; Ain Q.U. și colab., 2021]. Printre enzimele antioxidante care contribuie la neutralizarea SRO și a produșilor de oxidare *in vivo* se numără superoxid dismutaza și paraoxonaza, iar nivelurile și activitatea acestor enzime constituie indicatori importanți ai statusului oxidativ al sistemelor biologice [Hu C.T. și colab., 2021; Zhao F. și colab., 2021].

Numeroase boli sunt induse și evoluează pe seama creșterii stresului oxidativ și a celui inflamator, precum bolile cardiovasculare, hepatosteatoza, diabetul, cancerul, artritele sau boala inflamatorie intestinală [Vona R. și colab., 2019; Maloberti A. și colab., 2019]. Pentru tratarea acestor afecțiuni au fost dezvoltate o serie de tratamente, dar unele dintre acestea au eșuat parțial sau total în ameliorarea acestor boli, iar altele, deși au înregistrat rezultate semnificative s-au dovedit a avea efecte adverse (statinele, compușii chimioterapeutici, medicamentele nonsteroidogene) [Neha K. și colab., 2019]. În prezent există o continuă preocupare pentru găsirea de terapii eficiente, cu efecte secundare minime, pentru tratarea patologiilor determinate de creșterea stresului oxidativ și a celui inflamator. Unele studii au arătat că administrarea de antioxidanți ca tratament complementar prezintă unele beneficii, însă terapiile cu antioxidanți nu au dovedit un rezultat pozitiv clar în studiile clinice în cazul bolilor cardiovasculare sau al cancerului [Azzi A., 2017]. Eșecul terapiilor antioxidante existente se datorează parțial utilizării unor formulări care nu conferă stabilitate în circulație compușilor activi sau a unor doze mari, nocive [Moyer M. W., 2013]. Antioxidanții sunt esențiali pentru contracararea SRO, dar în egală măsură pentru potențialul lor de reglare genică, fiind cunoscut faptul că polifenolii, carotenoidele,  $\alpha$ -tocoferolul și flavonoidele sunt modulatori pentru numeroase gene care codifică receptori celulari, enzime, factori de transcriere sau proteine cheie din căile de semnalizare [Azzi A., 2017]. Polifenolii sunt compuși cu potențial antioxidant, însă biodisponibilitatea lor este foarte limitată datorită modificărilor enzimatiche rapide pe care le suferă *in vivo* și care blochează grupările hidroxil necesare pentru exercitarea proprietăților antioxidante [Azzi A., 2017]. Efectele benefice exercitate de compușii biologic activi extrași din plante sunt în strânsă legătură cu stabilitatea și biodisponibilitatea lor, precum și cu prezența sau absența efectelor adverse în raport de doza administrată.

Există produse disponibile comercial care pretind un conținut considerabil de compuși naturali, însă formularea lor sub formă de pudră, capsule sau extracte alcoolice nu le asigură stabilitate și o absorbție eficientă *in vivo*, astfel diminuând biodisponibilitatea compușilor și determinând necesitatea administrării unor doze mari pentru a atinge nivelul unei concentrații

efective *in vivo* necesară obținerii unor efecte benefice [Li J. și colab., 2015]. Însă utilizarea unor doze mari este însoțită de apariția efectelor adverse în cazul extractului de ghimbir [Zhu J. și colab., 2018]. Există disponibile comercial preparate pentru uz extern pe bază de lipozomi care conțin compuși naturali. În cercetarea biomedicală și de laborator, lipozomi cu un conținut în compuși biologice activi sunt utilizați în general pentru administrare invazivă, pe cale intra-venoasă [Ghanbarzadeh B. și colab., 2016]. Complanța pacienților la astfel de procedură invazivă în scop de prevenție sau chiar tratament este foarte scăzută.

**Fitozomii** sunt complexe moleculare lipidice cu structura asemănătoare celulelor, care se formează prin reacția între compuși polifenolici selectați sau din extracte din plante și gruparea fosfat sau trimetil amoniu a fosfolipidelor, precum fosfatidilcolina, asigurând o protecție sporită principiilor active din extracte naturale. Formularea fitozomică mărește absorbția ingredientelor active atunci când sunt aplicate local pe piele și îmbunătățește biodisponibilitatea sistemică atunci când este administrată oral. Există diferențe fizico-chimice importante între lipozomi și fitozomi, care conferă avantaje importante celor din urmă: (i) fitozomii sunt mai stabili datorită legăturilor de hidrogen formate între fosfolipide și compușii fenolici, în timp ce în lipozomi polifenolii sunt incorporați în partea centrală a acestora fără posibilitatea de interacție cu capul polar al fosfolipidelor; (ii) ponderea fosfolipidelor în fitozomi este mai mică comparativ cu lipozomii, ceea ce conferă o susceptibilitate foarte scăzută la oxidare [Li J. și colab., 2015]. Eficiența acestor complexe în a transporta principiile active și a le proteja proprietățile antioxidante și anti-inflamatoare depinde de atingerea unui echilibru între componentele acestor structuri care să le asigure stabilitatea în timp și eficiența terapeutică.

Până în prezent nu au fost obținuți fitozomi care să conțină principii active din rizomi de ghimbir și măceșe și nu a fost descrisă o metodă de obținere a unor astfel de particule.

Procedeul descris în această invenție permite obținerea unor formule de fitozomi care conțin extracte hidroalcoolice liofilizate de ghimbir și măceșe într-un raport care conferă stabilitate acestor particule și care conțin o cantitate maximă de principii active cu proprietăți antioxidante și anti-inflamatoare crescute față de extractele hidroalcoolice de la care se pleacă în prepararea lor.

Fitozomii FITOGINROSA vor putea fi utilizați pentru prevenirea și tratarea diferitelor patologii a căror evoluție este determinată de prezența unui stres oxidativ sau inflamator crescut, fără a prezenta efecte secundare. Potențialul terapeutic al fitozomilor FITOGINROSA va putea fi exploatat mai bine și datorită modului de administrare orală, complianța persoanelor la risc sau a pacienților la mijloacele terapeutice neinvazive fiind mai mare comparativ cu cele invazive (injecție intra-venoasă sau intra-musculară).

Formulele de fitozomi FITOGINROSA includ următoarele componente de bază: GINex liofilizat cu un conținut minim de 40% polifenoli totali și 3% 6-gingerol, în proporție de 25-45%

Stancu

Leșcu

(procente masice), optim fiind de 25%, care va fi combinat cu ROSAex liofilizat cu un conținut minim de 5% polifenoli totali și 0,3%  $\beta$ -caroten, în proporție de 5-25%, optim fiind 25%, combinat cu fosfatidilcolină în proporție optimă de 50%. GINex și ROSAex în diferitele rapoarte masice sunt solubilizate în etanol absolut, la 60°C, sub agitare magnetică, până când se obține o suspensie omogenă. Separat, se solubilizează fosfatidilcolină în etanol absolut și se adaugă încet, sub refluxare și agitare peste extractele solubilizate și se lasă să reacționeze timp de 2 ore, la 60°C. După evaporarea etanolului, compusul rezultat de culoare portocalie este hidratat cu apă și se sonichează timp de aproximativ 30 minute pe baia de apă pentru ajustarea dimensiunii particulelor, până când se obține o nanoemulsie.

Fitozomii FITOGINROSA obținuți prin procedeul descris în prezenta invenție au fost caracterizați din punct de vedere structural prin rezonanță magnetică nucleară (RMN) și din punct de vedere al compoziției fitochimice și a eficienței de încorporare a principiilor active prin cromatografie de lichide de performanță ultra-înaltă (UHPLC). Măsurarea dimensiunii particulelor și a potențialului Zeta s-a realizat prin metoda de împrăștiere dinamică a luminii laser (DLS), iar evaluarea morfologică s-a realizat cu ajutorul microscopiei electronice de transmisie (TEM). Totodată, fitozomii au fost caracterizați din punct de vedere al proprietăților antioxidante și anti-inflamatoare exercitate *in vitro* și *in vivo*, au fost evaluați pentru biodisponibilitatea principiilor active pe care le conțin și le eliberează în plasmă și diferite organe la șoareci, și au fost investigate eventualele efecte citotoxice pe care le pot induce.

Prin utilizarea fitozomilor FITOGINROSA care conțin principii active extrase din rizomii de ghimbir și fructe de măceș obținuți folosind procedeul descris în această invenție se poate interveni în scop preventiv sau terapeutic pentru diferite afecțiuni care apar și evoluează datorită inițierii și amplificării proceselor oxidative și inflamatorii.

### **Exemple:**

În continuare sunt prezentate concret etapele prin care poate fi realizată invenția.

#### **1. Prepararea și caracterizarea extractului hidroalcoolic de ghimbir**

Am preparat extractul hidroalcoolic de ghimbir (GINex) printr-o metodă descrisă și publicată anterior [Toma L. și colab., 2018, Carnuta M.G. și colab., 2018, Barbalata T. și colab., 2019]. Astfel, rizomii de ghimbir (origine, China), curățați, mărunțiți, uscați la 60°C și măcinați sub formă de pudră (80 g) au fost supuși extracției cu un amestec etanol-apa 8:2 (2000 mL) pe baie de apă cu ultrasunete, timp de 60 de minute, la 65°C. După filtrare, extractul hidroalcoolic a fost concentrat sub presiune redusă, la 40°C și apoi liofilizat. S-au obținut 27 g de pudră liofilizată de culoare galben-maronie de GINex cu un randament de extracție de 33,8%. GINex au fost

caracterizate din punct de vedere al conținutului de polifenoli totali, flavonoide totale, [6]-gingerol, [6]-shogaol și gingeroli totali.

### **Caracterizarea GINex liofilizat**

#### **Determinare polifenoli totali**

Am utilizat metoda Folin-Ciocalteu [Nagendra chari KL și colab., 2013] cu unele modificări [Carnuta M.G. și colab., 2018]. Protocolul de lucru este următorul: într-un tub Eppendorf de 2 mL am adăugat 0,2 mL probă (extract obținut conform metodei de mai sus) și 1 mL reactiv Folin-Ciocalteu (diluat 1:10). După 4 minute am adăugat 0,8 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> de concentrație 7,5% și am incubat amestecul timp de 2 ore la întuneric. Pentru proba martor, față de care se citește proba de interes, cei 0,2 mL de probă au fost înlocuiți cu 0,2 mL etanol 80%. Acidul galic a fost utilizat drept standard pentru trasarea curbei de calibrare pe domeniul de concentrații 50-500 μg/mL, utilizându-se același volum ca în cazul probei și urmând același protocol. Densitatea optică a probelor a fost măsurată la un spectrofotometru Infinite M200 PRO, TECAN, λ=765 nm, în placă cu 96 de godeuri. Am exprimat rezultatul în g Eq acid galic/100 g extract liofilizat (Tabel 1).

#### **Determinare flavonoide totale**

Pentru determinarea flavonoidelor totale am utilizat metoda Dowd [Adel S. și Prakash J., 2010; Carnuta M.G. și colab., 2018]. Pe scurt, am amestecat volume egale de extract etanolic și soluție AlCl<sub>3</sub> 5% în etanol 80% într-o placă cu 96 de godeuri. Proba martor, față de care se citește proba de interes, conține același volum de extract etanolic și de etanol 80% fără AlCl<sub>3</sub>. După 10 minute se citește absorbanta la λ=420 nm cu ajutorul unui spectrofotometru Infinite M200 PRO, TECAN. Pentru construirea curbei de calibrare am utilizat quercetina pe domeniul de concentrații 5-100 μg/mL. Rezultatul l-am exprimat în g Eq quercetină/100 g extract liofilizat (Tabel 1).

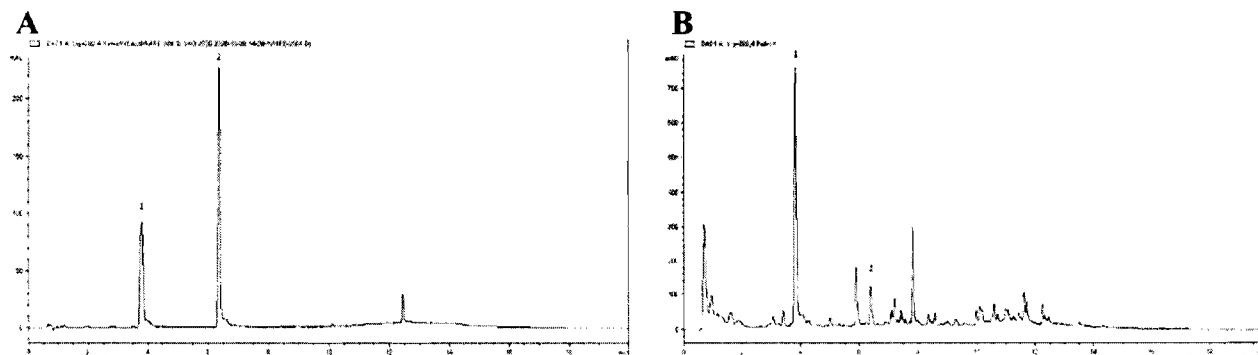
Separarea cromatografică a componentelor din GINex a fost realizată cu ajutorul unui sistem UHPLC (Agilent Technologies 1290 Infinity). Am utilizat o coloană Zorbax SB C18, 2.1 x 100 mm, 1.8 μm (Agilent, USA), iar faza mobilă a fost compusă din: (A) 0.1% acid formic și (B) acetonitril cu acid formic 0.1%, cu un debit de 0,3 mL/min. Am lucrat într-un gradient de eluție după cum urmează: 0 min - 40% B, 1 min - 40% B, 9 min - 80% B, 10 min - 95% B, 13 min - 95% B, 17 min - 40% B, 20 min - 40% B. Detecția a fost făcută la λ=282 nm, temperatura coloanei fiind de 50°C. Constituentul predominant prezent în ghimbir este [6]-gingerolul, iar 6-shogaolul este generat prin deshidratarea [6]-gingerolului pe durata procesării/stocării. Am trasat o curbă de calibrare de 6-gingerol și 6-shogaol pe domeniul de concentrații 5-50 μg/mL, iar cromatogramele pentru standarde și GINex sunt reprezentate în Figura 1.

Concentrațiile de polifenoli totali, flavonoide totale, [6]-gingerol și [6]-shogaol în preparatele de GINex liofilizate sunt prezentate în Tabelul 1.

*C. Stancu*

*J. Pop*





**Figura 1.** Cromatograma UHPLC–DAD reprezentând monitorizarea la 282 nm a standardelor de [6]-gingerol și [6]-shogaol (A) și a GINex (B); (1) [6]-gingerol și (2) [6]-shogaol.

**Tabel 1.** Conținutul de polifenoli totali, flavonoide totale, [6]-gingerol și [6]-shogaol al GINex liofilizate (exprimat în g/100 g GINex).

Nr. Crt.	Component	g/100 g GINex
1	Polifenoli totali (eq. acid galic)	40,88±0,48
2	Flavonoide totale (eq. quercetina)	1,70±0,17
3	[6]-Gingerol (UHPLC)	3,30±0,38
4	[6]-Shogaol (UHPLC)	0,29±0,01
5	Gingeroli totali (UHPLC)	9,00±0,09

## 2. Prepararea și caracterizarea extractului hidroalcoolic de măceșe (ROSAex)

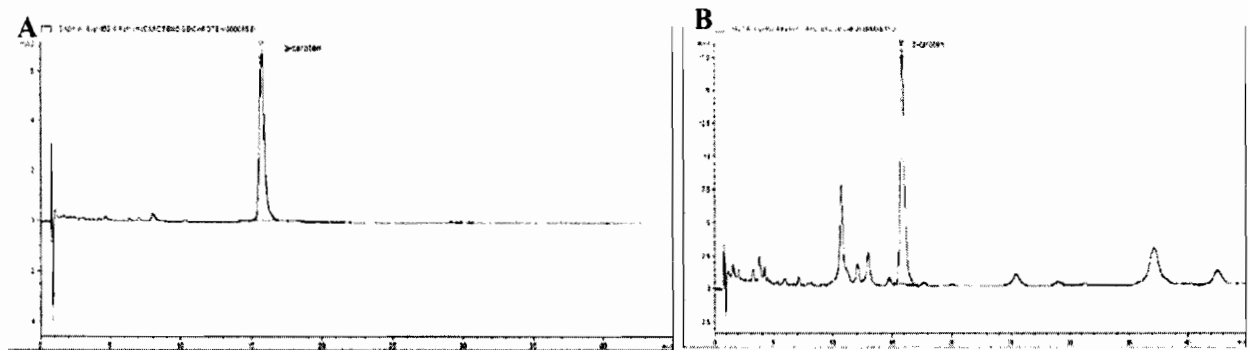
Fruite de măceș întregi, secționare, uscate la 70°C, timp de 48 de ore și ulterior măcinate sub formă de pudră (40 g) au fost supuse extracției cu un amestec etanol-apă 9:1 (320 mL) la o temperatură de 50°C, sub agitare magnetică, timp de 6 ore. Amestecul rezultat a fost filtrat și apoi concentrat la presiune redusă, la 40°C până la evaporarea alcoolului, iar reziduu obținut a fost liofilizat. Am obținut 9,2 g de pudră liofilizată de ROSAex de culoare roșie. Randamentul de extracție a fost de 23% .

Am caracterizat ROSAex din punct de vedere al conținutului de carotenoide, polifenoli și flavonoide. Conținutul în carotenoide totale a fost determinat printr-o metodă UHPLC [Olives Barba A.I. și colab., 2006]. Pentru extracția carotenoidelor am utilizat un amestec de extracție compus din hexan/acetona/etanol în raport 50/25/25. Astfel, peste cca. 50 mg ROSAex liofilizat am adăugat 0,5 mL amestec de extracție și am sonicat pe baia de apă timp de 20 minute. Amestecul a fost apoi centrifugat la 10.000g, timp de 10 minute. Am transferat stratul organic într-un alt tub

*Olives Barba*

*[Signature]*

și am reluat extracția cu 0,5 mL amestec în aceleași condiții. Fazele organice reunite au fost evaporate la sec în curent de azot. Am dizolvat apoi reziduul în 1 mL amestec de tetrahidrofuran/acetonitril/metanol în raport de 15/30/55. Proba vortexată și filtrată prin filtru de 0,2  $\mu\text{m}$ , am injectat-o în sistemul UHPLC (Agilent Technologies 1290 Infinity). Separarea s-a realizat pe o coloană Zorbax SB C18, 2.1 x 100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ , cu ajutorul unei faze mobile compusa din A - metanol 90% și B - acetonitril 10%, la un debit de 0,3 mL/min. Temperatura în coloană a fost de 30°C, iar detecția s-a făcut la  $\lambda = 450 \text{ nm}$ . Am lucrat în regim izocrat, timp de 45 minute. Am trasat o curbă de calibrare pentru  $\beta$ -caroten pe domeniul de concentrații 1-40  $\mu\text{g/mL}$ , iar cromatogramele pentru standard și ROSAex sunt reprezentate în Figura 2. Rezultatele obținute sunt cuprinse în Tabelul 2.



**Figura 2.** Cromatograma UHPLC-DAD a unui standard de  $\beta$ -caroten de concentrație 5  $\mu\text{g/ml}$  (A) și a ROSAex liofilizate (B) cu detecție la 450 nm (carotenoide).

Pentru determinarea conținutului de polifenoli totali și flavonoide totale am folosit metodele utilizate pentru caracterizarea GINex, iar rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2.

**Tabel 2.** Conținutul de polifenoli, flavonoide și carotenoide al ROSAex liofilizate (g/100g).

Nr. crt.	Principiul activ	g/100 g ROSAex
1	Polifenoli totali	5,42 $\pm$ 0,09
2	Flavonoide totale	0,041 $\pm$ 0,005
3	Carotenoide totale (UHPLC)	0,342
4	$\beta$ -caroten (UHPLC)	0,297

### 3. Prepararea fitozomilor cu GINex și ROSAex (FITOGINROSA)

Metoda de obținere a fitozomilor care conțin GINex și ROSAex, denumiți FITOGINROSA, a fost optimizată pornind de la metodele existente în literatură [Direito R. și colab., 2019], pe baza determinărilor de stabilitate a acestor structuri și măsurarea efectelor lor

*C. Hauer*

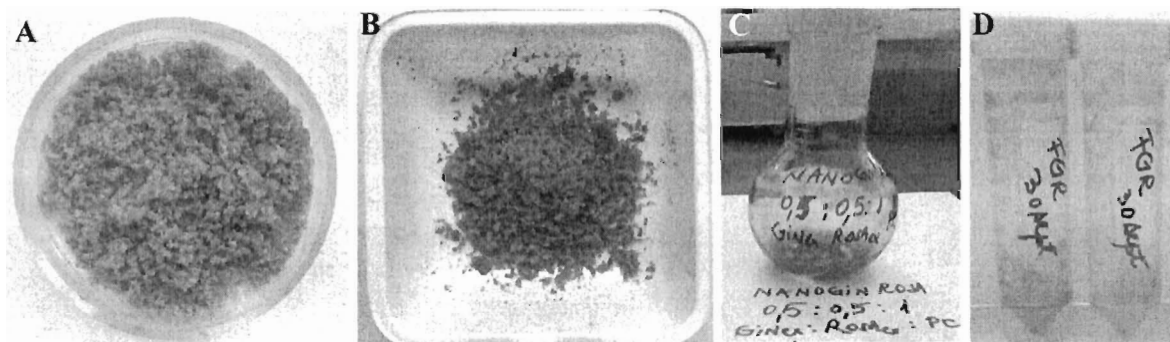
*[Signature]*

antioxidante și anti-inflamatoare atât *in vitro* cât și *in vivo*. FITOGINROSA au fost produși prin agitarea în condiții termice controlate a unui amestec de GINex, ROSAex și fosfatidilcolină (FC) într-un mediu nepolar, urmată de rotaevaporare, hidratare și ajustarea dimensiunii particulelor prin sonicare.

#### EXEMPLUL 1

FITOGINROSA în rapoarte masice GINex:ROSAex:FC – 0,5:0,5:1.

Am dizolvat 500 mg de GINex (Figura 3A), 500 mg de ROSAex (Figura 3B) în 100 mL etanol absolut la o temperatură de 60°C, în balon cu refluxare și sub agitare magnetică până când s-a obținut o suspensie omogenă. Separat, am solubilizat 1000 mg FC de soia în 25 mL etanol absolut, pe care am adăugat-o încet, sub refluxare și agitare peste extractele solubilizate și care au reacționat timp de 2 ore, la 60°C. Am evaporat etanolul sub presiune scăzută cu ajutorul unui rotaevaporator. A rezultat un compus cleios/uleios, translucid, de culoare portocalie pe care l-am hidratat cu 40 mL apă și am ajustat dimensiunea particulelor prin sonicare pe baie de apă timp de aproximativ 30 minute. Am caracterizat fitozomii din punct de vedere al dimensiunii, polidispersității și al potențialului Zeta, verificând stabilitatea la 4°C timp de o lună. O parte din fitozomi am liofilizat-o în vederea păstrării pe termen mai lung (Figura 3C, D).



**Figura 3.** Aspectul preparatelor liofilizate de GINex (A) și ROSAex (B) folosite pentru obținerea FITOGINROSA - 0,5:0,5:1 (GINex:ROSAex:FC) (C, D); C - după rotaevaporare, D - după liofilizare.

#### EXEMPLUL 2

FITOGINROSA în rapoarte masice GINex:ROSAex:FC – 0,75:0,25:1.

Am procedat la fel ca în Exemplul 1 cu mențiunea că am cântărit 750 mg GINex, 250 mg ROSAex și 1000 mg FC.

#### EXEMPLUL 3

FITOGINROSA în rapoarte masice GINex:ROSAex:FC – 0,9:0,1:1.

Altauer

Stel

Am procedat la fel ca în Exemplul 1 cu mențiunea că am cântărit 900 mg GINex, 100 mg ROSAex și 1000 mg FC.

#### EXEMPLUL 4

FITOGIN - Am procedat la fel ca în Exemplul 1 cu mențiunea că am cântărit 1000 mg GINex și 1000 mg FC.

#### 4. Caracterizarea FITOGINROSA

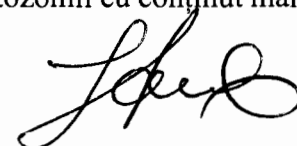
FITOGINROSA (FGR), preparat liofilizat, a fost caracterizat din punct de vedere al **compoziției fitochimice** prin tehnica UHPLC și din punct de vedere **structural**, prin tehnica RMN. Astfel, am determinat concentrația de 6-gingerol și  $\beta$ -caroten din fiecare tip de preparat utilizând metodele UHPLC descrise mai sus, iar rezultatele sunt cuprinse în Tabelul 3.

**Tabel 3.** Conținutul de 6-gingerol și  $\beta$ -caroten în cele 4 tipuri de fitozomi.

Nr. crt.	g/100 g	Exemplu 1 FGR 0,5:0,5:1	Exemplu 2 FGR 0,75:0,25:1	Exemplu 3 FGR 0,9:0,1:1	Exemplu 4 FITOGIN 1:1
1	6-gingerol	0,500	0,844	1,020	1,140
2	$\beta$ -caroten	0,074	0.03	0,010	-

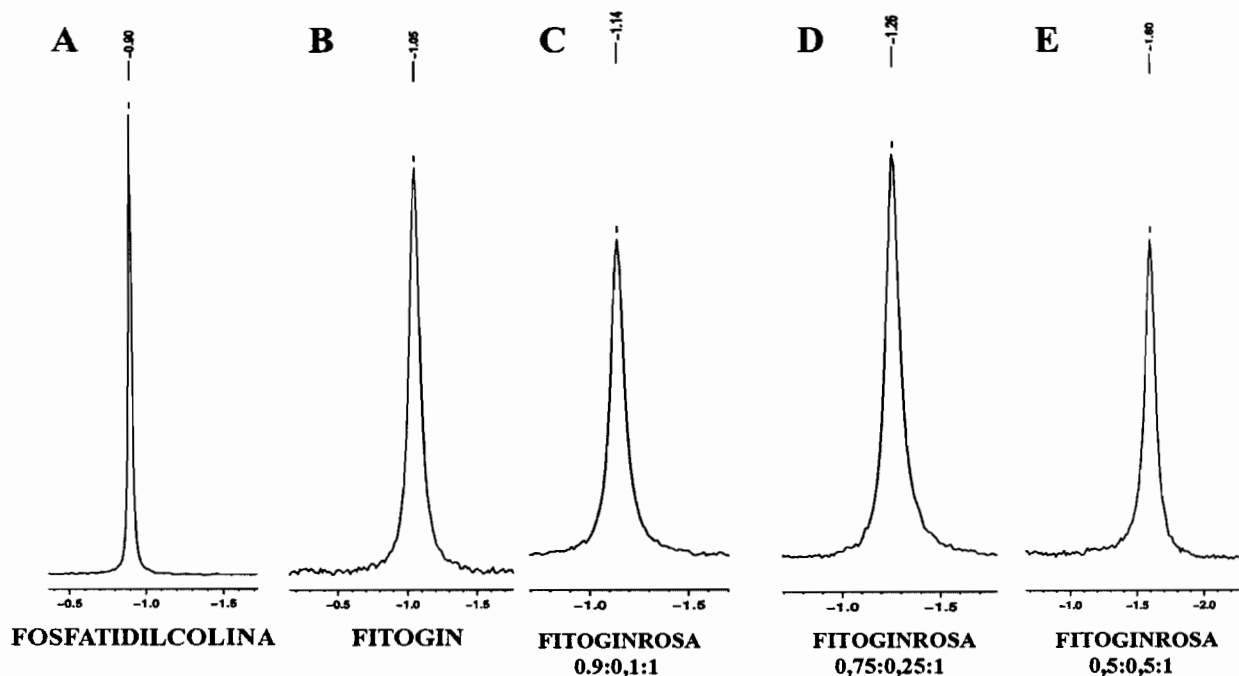
Spectrele RMN au fost înregistrate în cloroform deuterat ( $\text{CDCl}_3$ ), în tuburi de 5 mm de calitate Wilmad 507 la concentrații de aproximativ 50 mg/mL pentru FC, GINex și fitozomi (FITOGIN, FITOGINROSA), și la concentrație de 13 mg/mL pentru ROSAex (datorită solubilității mici) pe un spectrometru de tipul Bruker Avance Neo 400. Spectrele  $^1\text{H}$ -RMN au fost înregistrate la frecvența de 400,13 MHz, pe o fereastră spectrală de 38 ppm, cu 128 scanări, timp de achiziție 4 s, timp de relaxare de 1 s, cu un puls de  $30^\circ$ . Spectrele  $^{31}\text{P}$ -RMN au fost înregistrate la frecvența de 161,97 MHz, pe o fereastră spectrală de 400 ppm, cu 128 scanări, timp de achiziție 0,5 s, timp de relaxare de 2 s, puls de  $30^\circ$  și decuplare de hidrogen tip WALTZ16.

Spectrul  $^{31}\text{P}$ -RMN al FC prezintă un semnal la deplasarea chimică  $\delta = -0,90$  ppm. Efectul de ecranare este proporțional cu cantitatea de ROSAex în fitozomii micști GINex:ROSAex:FC. Astfel, deplasarea chimică este de -1,05 în FITOGIN și -1,14, -1,21, -1,26, și -1,60 ppm, pentru rapoartele masice GINex:ROSAex:FC de 0,9:0,1:1, 0,75:0,25:1 și respectiv 0,5:0,5:1. Spectrele înregistrate pentru fiecare preparat sunt prezentate în Figura 4. Ecranarea atomului de fosfor din FC este cu atât mai pronunțată cu cât sarcina negativă de la atomul de oxigen legat de fosfor este mai localizată. Astfel, fitozomii cu conținut mare de ROSAex realizează o izolare mai eficientă a grupei P-O și implicit o înglobare mai eficientă a FC în fitozom, iar fitozomii cu conținut mai mic

de ROSAex permit o expunere mai mare a grupei P-O<sup>-</sup> și implicit a electronilor neparticipanți către grupări mai electropozitive din molecule vecine. Acest lucru poate fi explicat prin legarea cu atât mai puternică a grupei trimetilamoniu (Me<sub>3</sub>N<sup>+</sup>) în fitozomi cu cât cantitatea de ROSAex este mai mare, fapt care lasă grupa fosfat (P-O<sup>-</sup>) mai ecranată de electronii neparticipanți. Spectrele înregistrate pentru fiecare preparat sunt prezentate în Figura 4.

Din punct de vedere al caracteristicilor fizice (dimensiune, distribuția dimensiunii, potențial Zeta), al eficienței la încărcare (% UHPLC) și morfologic prin microscopie de transmisie electronică (TEM), analiza se face pe compusul reconstituit în apă ultrapură în raport 1:10 (fitozomi:apă) și sonicare timp de 30 minute pe baie de apă.



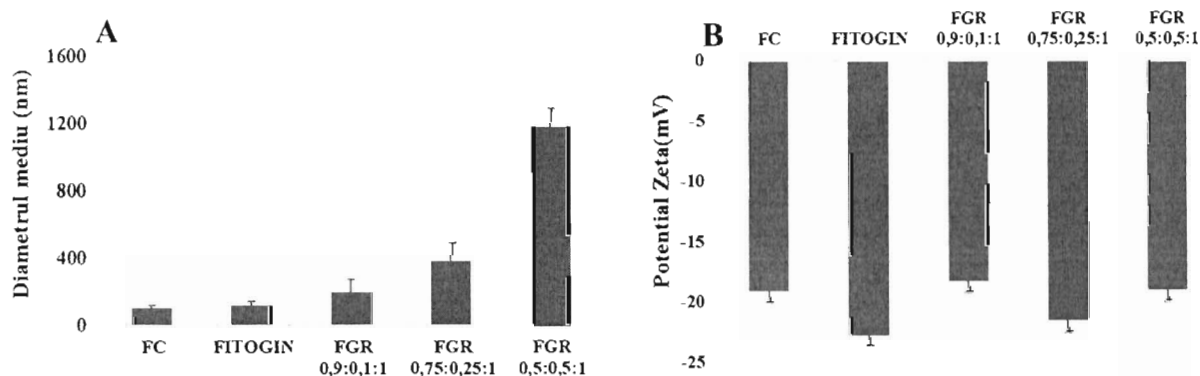
**Figura 4.** Spectrul <sup>31</sup>P-RMN al fosfatidilcolinei (A), FITOGIN (B), FITOGINROSA cu rapoarte masice 0,9:0,1:1 (C), 0,75:0,25:1 (D) și respectiv 0,5:0,5:1 (E).

Am caracterizat fitozomii din punct de vedere al **dimensiunii particulelor** și al **potențialului Zeta** cu ajutorul unui dispozitiv Zetasizer Nano ZS (ZEN 3600) (Malverne Instruments, Marea Britanie). Dimensiunea și distribuția dimensiunii fitozomilor au fost determinate folosind metoda DLS. Probele au fost diluate 1 μL la 2 mL cu apă ultrapură, astfel încât să avem o intensitate optimă a împrăstierii. Au fost măsurate intensitățile luminii împrăștiată la un unghi de 173° cu ajutorul unei metode standard de operare. Diametrul hidrodinamic mediu al fitozomilor a fost în jur de 1100-1300 nm, având un indice de polidispersie mare, fiind cuprins între 0,3 și 0,8, ca urmare a prezenței mai multor populații care au dimensiuni cuprinse între 100nm până la 2000 nm. În aceeași cuvetă de măsurare, după determinarea dimensiunii, am introdus un

*A. Băncu*

*[Signature]*

electrod (ZEN1002) pentru determinarea potențialului Zeta( $\zeta$ ). Acesta a fost măsurat folosind dispersia luminii electroforetice (ELS). Am efectuat 5 măsurători consecutive la 5 V cu o întârziere de 300 secunde între măsurători. Rezultatele au fost analizate folosind software-ul Zetasiser Software 7.12 (Malvern Instruments). Fitozomii sunt încărcăți negativ, între -16 și -22 mV, ceea ce indică o bună stabilitate (Tabel 4 și Figura 5B). Fitozomii FITOGINROSA prezintă mai multe populații de particule, dimensiunea acestora crescând pe măsură ce crește concentrația de ROSAex, în acord cu miografiile TEM prezentate în Figura 6. Astfel, particulele de FITOGINROSA 0,9:0,1:1 prezintă o dimensiune medie de ~190nm, FITOGINROSA 0,75:0,25:1 ~380nm, iar FITOGINROSA 0,5:0,5:1 prezintă o dimensiune medie de ~1180 nm (Figura 5A).



**Figura 5.** Reprezentarea grafică a dimensiunii (A) și a potențialului Zeta (B) pentru particulele lipidice de FITOGINROSA în cele trei formulări comparativ cu FITOGIN și fosfatidilcolina (FC).

Pentru a determina **Eficiența de încărcare (EI, %)** în fitozomi, am separat 6-gingerolul și  $\beta$ -carotenul liber de nanoemulsie prin centrifugare utilizând o membrană filtrantă Amicon Ultra 100 Kda la 14000g, timp de 30 minute. Am determinat apoi 6-gingerolul și  $\beta$ -carotenul din filtrat prin UHPLC conform metodelor descrise mai sus. Eficiența de încărcare (EI, %) a fost calculată utilizând formula:

$$EI (\%) = (6\text{-gingerol total} - 6\text{-gingerol liber (în filtrat)}) / 6\text{-gingerol total} \times 100$$

Similar am procedat și pentru determinarea EI (%) a  $\beta$ -carotenului. Procentele de incorporare pentru 6-gingerol (83%) și  $\beta$ -caroten (94%) sunt foarte ridicate și dovedesc eficiența mare la încărcare a fitozomilor pentru principiile active din GINex și ROSAex (Tabel 4).

**Stabilitatea în timp** a FITOGINROSA a fost verificată pe preparate sub formă de nanoemulsie, păstrate la 4°C. Timp de 30 de zile de la preparare, nanoemulsia de FITOGINROSA a fost stabilă și nu am observat o separare de faze a componentelor, iar rezultatele sunt prezentate în Tabelul 4.

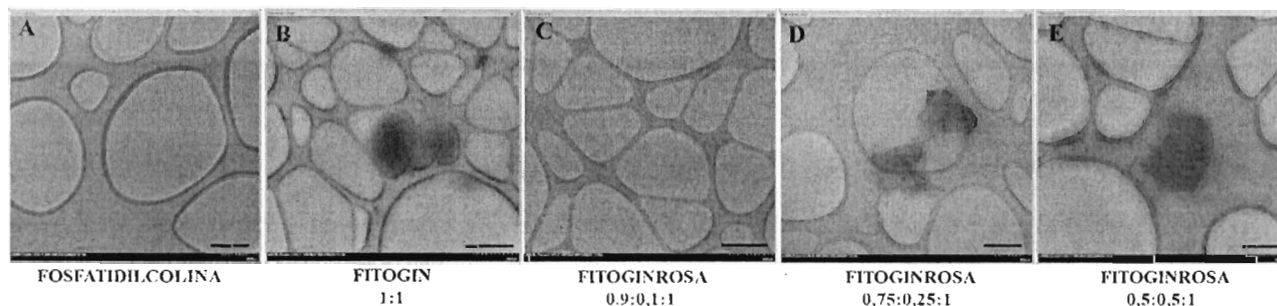
*Oltauca*

*Stăvilă*

**Tabel 4.** Valorile obținute pentru dimensiunea particulelor, indexul de polidispersie (PDI), potentialul Zeta, conținutul de  $\beta$ -caroten și 6-gingerol și eficiența lor de încapsulare și stabilitatea în timp a nanoemulsiei de FITOGINROSA cu GINex:ROSAex:FC în raport masic de 0,5:0,5:1.

Stabilitate 4°C	Z-average (nm)	PDI	Zeta- potential (mV)	$\beta$ -caroten ( $\mu\text{g/mL}$ )	6-gingerol ( $\mu\text{g/mL}$ )	Eficiența la încarcare 6-gingerol (%)	Eficiența la încarcare $\beta$ -caroten (%)
T0	1328 $\pm$ 123	0,775 $\pm$ 0,058	-16,6 $\pm$ 6,0	15,1 $\pm$ 1,6	93,4 $\pm$ 4,3	83,3 $\pm$ 3,4	94,3 $\pm$ 4,5
T7 zile	1143 $\pm$ 113	0,345 $\pm$ 0,068	-18,9 $\pm$ 5,7	13,4 $\pm$ 1,2	93,6 $\pm$ 3,7	-	
T15 zile	1187 $\pm$ 213	0,609 $\pm$ 0,093	-22,6 $\pm$ 7,8	12,7 $\pm$ 0,7	92,9 $\pm$ 2,5	-	
T30 zile	1243 $\pm$ 243	0,869 $\pm$ 0,107	-19,8 $\pm$ 6,3	11,9 $\pm$ 0,9	90,6 $\pm$ 2,4	-	

Am realizat **caracterizarea morfologică** a fitozomilor prin tehnica TEM. Procedeu a presupus depunerea unei picături din probă pe o rețea de cupru acoperită cu carbon timp de 1 minut. Excesul de soluție a fost îndepărtat folosind o hârtie de filtru, apoi eșantionul a fost investigat folosind un microscop electronic cu transmisie HT7700 (Hitachi) care funcționează la 100 kV în modul de contrast ridicat, iar imaginile obținute sunt prezentate în Figura 6.



**Figura 6.** Micrografii TEM prezentând în detaliu morfologia celor 3 formulări de FITOGINROSA comparativ cu fosfatidilcolina și FITOGIN; A, D și E – bara de scară 200 nm, B și C – bara de scară 500 nm.

Din miografiile TEM de mai sus se poate observa că particulele lipidice de FC sunt sferice și polidisperse, iar cele de FITOGIN sunt alungite și cu un grad mare de polidispersitate. Același lucru se observă și în cazul FITOGINROSA. Particulele lipidice cresc pe măsură ce crește ponderea de ROSAex în compoziția fitozomilor. În FITOGINROSA 0,5:0,5:1 se vede foarte clar ca există tendința de agregare.

Scopul acestui patent este de obținere a unor fitozomi în care conținutul de GINex și ROSAex să fie cât mai mare în condițiile asigurării stabilității acestor structuri pe termen cât mai lung, cu menținerea proprietăților antioxidante și anti-inflamatoare. FITOGINROSA au fost păstrate în formă liofilizată până la testarea proprietăților lor antioxidante și anti-inflamatoare *in vitro* și *in vivo*.

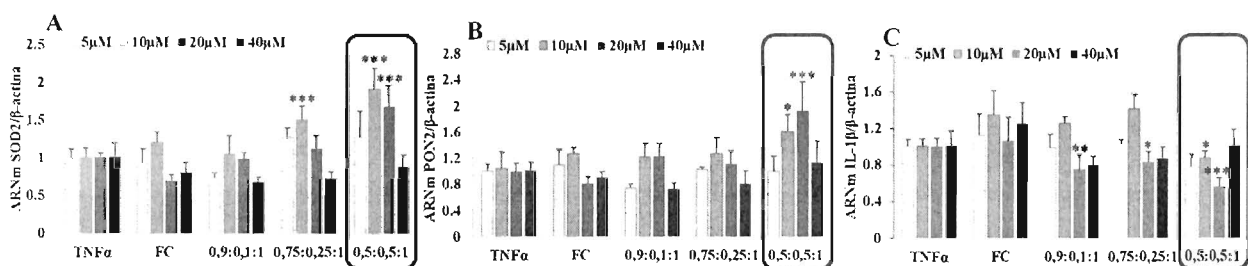
*Alta*

*[Signature]*

### 5. Selectarea formulării și concentrației optime de FITOGINROSA în funcție de proprietățile antioxidante și anti-inflamatoare determinate *in vitro*

Celule enterocite din linia Caco2 și celule endoteliale (CE) din linia EAhy.926 (ATCC, Manassas, VA, SUA) au fost utilizate pentru a selecta formularea și concentrația optimă de FITOGINROSA, în funcție de efectele antioxidante și anti-inflamatoare ale fitozomilor.

Celulele enterocite conflente au fost pre-incubate timp de 6 ore cu mediul de cultură conținând FITOGINROSA, apoi am adăugat TNF $\alpha$  (20 ng/mL) în mediu pentru încă 18 ore. TNF $\alpha$  a fost folosit pentru a induce în celule stres oxidativ și inflamator [Toma L. și colab., 2018]. Celulele au fost incubate cu FITOGINROSA în cele trei formulări (rapoarte masice) GINex:ROSAex:FC 0,9:0,1:1, 0,75:0,25:1 și 0,5:0,5:1. Au fost testate patru concentrații din fiecare formulare exprimate în echivalent 6-gingerol: 5, 10, 20 și 40  $\mu$ M. În paralel, am folosit drept control celule incubate doar cu TNF $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) sau celule incubate cu TNF $\alpha$  și FC (FC) în concentrație echivalentă celei din FITOGINROSA. După 24 ore de la incubare, celulele enterocite au fost prelucrate pentru evaluarea expresiei genice a unor proteine indicatori ai statusului antioxidant (paraoxonaza 2 – PON2, superoxid dismutaza 2 – SOD2) și inflamator (IL-1 $\beta$ ). Pentru măsurarea expresiei genice am izolat ARN total din celule folosind reactivul TRIZOL (Life Technologies). Am revers-transcris 1-2  $\mu$ g din ARN-ul obținut folosind enzima MultiScribe Reverse Transcriptase (Life Technologies), conform cu recomandările producătorilor. Am amplificat ADN-ul complementar obținut, folosind SyBr Select Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, SUA) și primeri specifici pentru genele SOD2, PON2, IL-1 $\beta$  și  $\beta$ -actina (gena de referință). Pentru amplificare am folosit sistemul ViiA7 Real-Time PCR (Applied Biosystems, CA, SUA). Cuantificarea relativă a produșilor de amplificare s-a făcut raportat la celulele incubate doar cu TNF $\alpha$  cărora le-am atribuit valoarea 1. Rezultatele obținute au evidențiat faptul că formularea FITOGINROSA 0,5:0,5:1, în concentrație de 10 și 20  $\mu$ M echivalent 6-gingerol a stimulat cel mai bine expresia genică a enzimelor antioxidante SOD2 și PON2 și concentrația de 20  $\mu$ M a inhibat cel mai mult expresia genică a moleculei pro-inflamatorii IL-1 $\beta$ , marcate în chenar în graficele din Figura 7.



**Figura 7.** Efectul antioxidant și anti-inflamator al FITOGINROSA în diferite rapoarte masice GINex:ROSAex:FC (0,9:0,1:1, 0,75:0,25:1 și 0,5:0,5:1) și la diferite concentrații

Chitan

Stel



echivalent 6-gingerol (5, 10, 20 și 40  $\mu\text{M}$ ) asupra enterocitelor activate cu  $\text{TNF}\alpha$ . Expresia genică pentru SOD2 (A), PON2 (B) și IL-1 $\beta$  (C) este reprezentată comparativ cu celule expuse la  $\text{TNF}\alpha$  sau la  $\text{TNF}\alpha$  + fosfatidilcolină (FC). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  pentru  $\text{TNF}\alpha$ +FITOGINROSA vs.  $\text{TNF}\alpha$ .

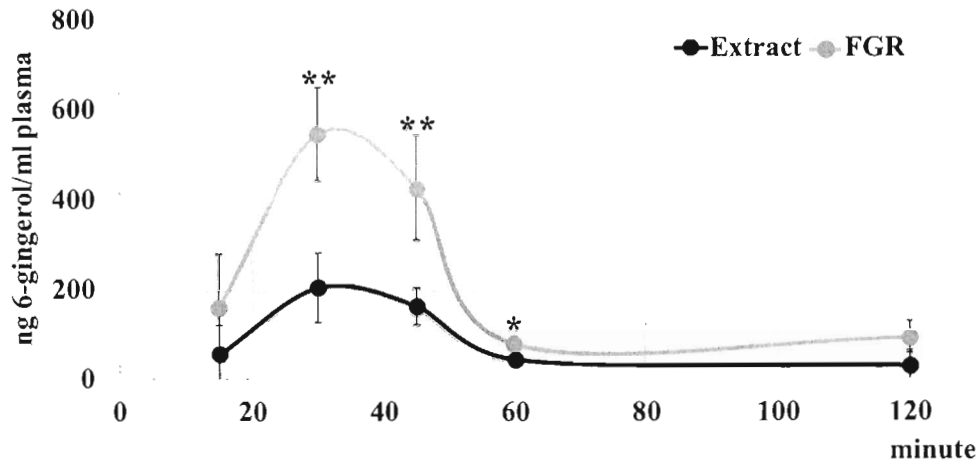
Expresia genică a enzimei antioxidante SOD2 crește semnificativ și în cazul celulelor Caco2 expuse la FITOGINROSA cu raport masic 0,75:0,25:1-10  $\mu\text{M}$ , dar mai puțin comparativ cu FITOGINROSA 0,5:0,5:1-20  $\mu\text{M}$ , iar FITOGINROSA cu raportul 0,9:0,1:1 nu a prezentat efect antioxidant, sugerând că extractul de măceșe în concentrație mai mare este benefic deoarece susține proprietățile antioxidante ale extractului de ghimbir. Expresia genică a moleculei pro-inflamatorii IL-1 $\beta$  a scăzut și în cazul celulelor Caco2 incubate cu FITOGINROSA 0,75:0,25:1-20  $\mu\text{M}$  și 0,9:0,1:1-20  $\mu\text{M}$ , însă mult mai puțin comparativ cu FITOGINROSA 0,5:0,5:1-20  $\mu\text{M}$  (Figura 7). Pe baza acestor rezultate, am folosit mai departe în experimente, FITOGINROSA în raport masic 0,5:0,5:1.

## 6. Biodisponibilitatea principiilor active din FITOGINROSA

Pentru a determina biodisponibilitatea principiilor active din FITOGINROSA comparativ cu cea a amestecului de extracte hidroalcoolice GINex+ROSAex în cantități echivalente, am efectuat un experiment de farmacocinetică în care am utilizat un lot de șoareci din linia C57Bl/6J, masculi, cu vârsta de 15-20 săptămâni și greutatea corporală de  $26,65 \pm 2,3$  g. Animalele au primit prin gavaj un volum maxim de 200  $\mu\text{L}$  FITOGINROSA (formularea 0,5:0,5:1) reconstituit din pudra liofilizată sau GINex+ROSAex, în concentrație de 9,2 mg 6-gingerol/kg corp. După administrarea preparatelor, la intervale de timp de 15, 30, 45, 60 și 120 minute, animalele au fost anesteziate cu supradoză de ketamină/xylazină și a fost prelevat prin puncție cardiacă un volum de 500-700  $\mu\text{L}$  de sânge pe EDTA (ca anticoagulant). Probele de sânge au fost menținute pe gheață până la centrifugare și obținerea plasmei, care a fost păstrată la  $-80^\circ\text{C}$  până la cuantificarea nivelului de 6-gingerol liber după o metodă descrisă anterior de Kim M.G. și colab. (2012). Pentru fiecare interval de timp am utilizat un număr de 3 animale. Rezultatele au arătat o creștere de 2-3 ori a concentrației de 6-gingerol liber în plasma animalelor care au primit FITOGINROSA comparativ cu cele care au primit GINex+ROSAex pe intervalul de timp 15 - 120 minute (Figura 8). Aceste date dovedesc faptul că formularea principiilor active din extractele hidroalcoolice GINex și ROSAex în fitozomi asigură o absorbție crescută a acestora în circulație și o menținere a acestui nivel în plasmă pe durata a minim două ore.

Alauren

Ștefan

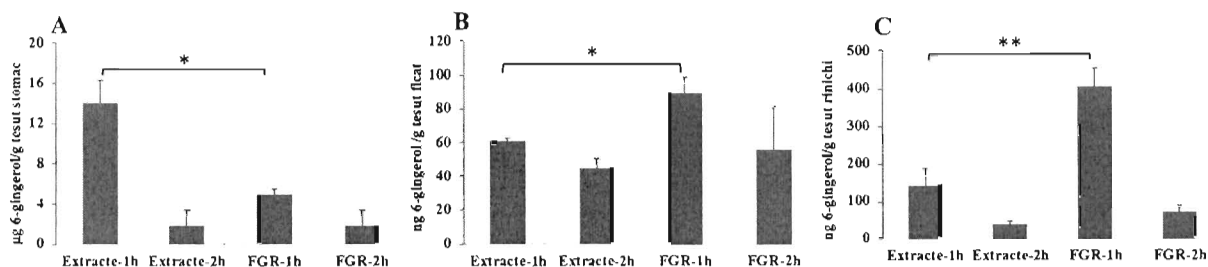


**Figura 8.** Concentrația de 6-gingerol liber în plasma șoarecilor C57Bl/6J care au primit FITOGINROSA (FGR) comparativ cu cei care au primit GINex+ROSAex (Extract), la 15, 30, 45, 60 și 120 minute de la momentul gavajului. Rezultatele sunt prezentate ca medie  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  și \*\* $p < 0,01$  FGR comparativ cu GINex+ROSAex.

La interval de 60 și 120 minute de la administrarea prin gavaj a FITOGINROSA sau GINex+ROSAex, animalele anesteziate cu supradoză de ketamină/xylazină au fost supuse procedurii de laparotomie pentru prelevarea de organe în vederea determinării concentrației de 6-gingerol liber în țesuturile respective. Astfel, animalele au fost supuse perfuzării cu soluție salină (ser fiziologic) pentru spălarea vasculaturii, urmată de prelevarea stomacului, pancreasului, ficatului, splinei, rinichiului, cordului și plămânului. Imediat după prelevare, organele au fost secționare în piese mici și înghetate rapid în azot lichid, apoi păstrate la  $-80^{\circ}\text{C}$  până la analiza ulterioară. Pentru determinarea concentrației de 6-gingerol liber în țesuturile prelevate,  $\sim 200$  mg țesut a fost omogenizat în soluție salină (ser fiziologic) prin marunțire și sonicare pe gheață, urmată de extracția în acetonitril, după precipitarea proteinelor, concentrare în curent de azot, dizolvarea rezidului în etanol 80% și cuantificare UHPLC. Am utilizat drept standard intern 500 ng de nonivamide [Kim M.G. și colab., 2012]. Am raportat conținutul de 6-gingerol liber (ng) la cantitatea de țesut exprimată în grame. Cuantificarea conținutului de 6-gingerol liber în organele prelevate a evidențiat faptul că administrarea principiilor active ale GINex și ROSAex sub formă de fitozomi a condus la scăderea de  $\sim 3$  ori a concentrației acestora la nivelul stomacului, ceea ce sugerează o absorbție mai bună la nivelul tubului digestiv comparativ cu administrarea lor sub formă de extract hidroalcoolic (Figura 9A).

C. Stancu

Loe



**Figura 9.** Concentrația de 6-gingerol liber în stomac (A), ficat (B) și rinichi (C) de la șoareci C57Bl/6J care au primit FITOGINROSA (FGR) comparativ cu cei care au primit GINex+ROSAex (Extracte), la o oră și două ore de la gavaj. Rezultatele sunt prezentate ca medie  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  și \*\* $p < 0,01$  FGR la o oră comparativ cu GINex+ROSAex la o oră.

În cord, splină și pancreas nivelul de 6-gingerol liber a fost sub limita de detecție a metodei folosite. La animalele care au primit FITOGINROSA am determinat după o oră de la administrare o concentrație de 6-gingerol liber crescută cu 50% la nivelul ficatului și de ~ 3 ori mai mare în rinichi, comparativ cu animalele care au primit extractul hidroalcoolic (Figura 9B și 9C). Aceste rezultate care evidențiază nivelul crescut de principii active la nivel tisular sugerează o acțiune anti-oxidantă și anti-inflamatoare prelungită a extractelor în unele organe, în urma administrării lor sub formă de fitozomi.

## 7. Proprietatile antioxidante si anti-inflamatoare exercitate de FITOGINROSA *in vivo*

Pentru a evalua *in vivo* potențialul antioxidant și anti-inflamator al FITOGINROSA cu formula selectată la Capitolul 6 (GINex:ROSAex:FC - 0,5:0,5:1), am administrat preparatul la șoareci C57Bl/6J cărora le-am indus ulterior inflamație sistemică prin administrarea de lipopolizaharide (LPS) intra-peritoneal (i.p.) în doză sub-lethală de 0,2 mg LPS/kg corp [Fuior EV și colab., 2020]. Anterior administrării LPS, animalele au primit prin gavaj, timp de 7 zile, 100  $\mu$ L de FITOGINROSA în concentrație de 4.5 mg 6-gingerol/kg corp (n=8), GINex+ROSAex în cantitate echivalentă celei existente în FITOGINROSA (n=7), FC în concentrație echivalentă celei existente în FITOGINROSA (n=7) sau apă (n=6). Toate animalele au primit apoi LPS prin injectare i.p. și au fost menținute cu acces liber la hrană și apă timp de 16-18 ore. După acest interval de timp, animalele au fost anesteziate cu supradoză de ketamină/xylazină. Un volum de 500-600  $\mu$ L de sânge a fost recoltat prin puncție cardiacă și procesat pentru obținerea serului. Probele de ser au fost păstrate la -80°C până la efectuarea determinărilor de interes.

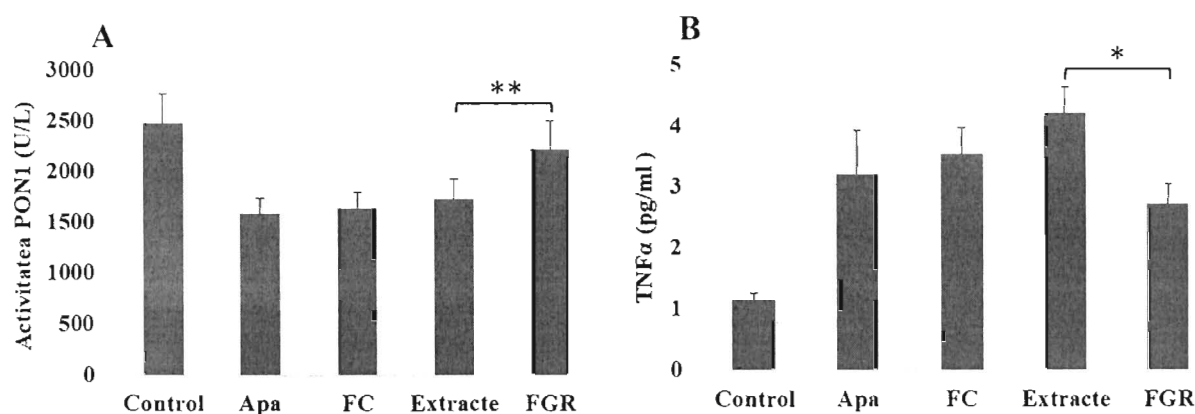
Activitatea enzimei antioxidante paraoxonaza 1 (PON1) a fost măsurată în ser drept capacitatea acesteia de a hidroliza substratul paraoxon folosind o metodă descrisă anterior

Altauc

Spicul

[Rosenberg O. și colab., 2005]. Nivelurile serice de TNF $\alpha$  au fost determinate cu ajutorul unui kit ELISA Mouse TNF- $\alpha$  DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MN, SUA).

Tratamentul cu FITOGINROSA anterior inducerii inflamației sistemice cu LPS la șoareci C57Bl/6J a avut ca efect menținerea unui nivel semnificativ crescut (30%) al activității enzimei antioxidante PON1 comparativ cu grupul de animale care a primit apă, FC sau combinația celor două extracte hidroalcoolice (Figura 10A). Pentru a evalua proprietățile anti-inflamatoare ale preparatului FITOGINROSA am determinat nivelurile serice de TNF $\alpha$  și rezultatele evidențiază o reducere cu 35% a nivelului acestui factor pro-inflamator la șoarecii care au primit FITOGINROSA comparativ cu cei care au primit mix-ul de extracte hidroalcoolice (Figura 10B).

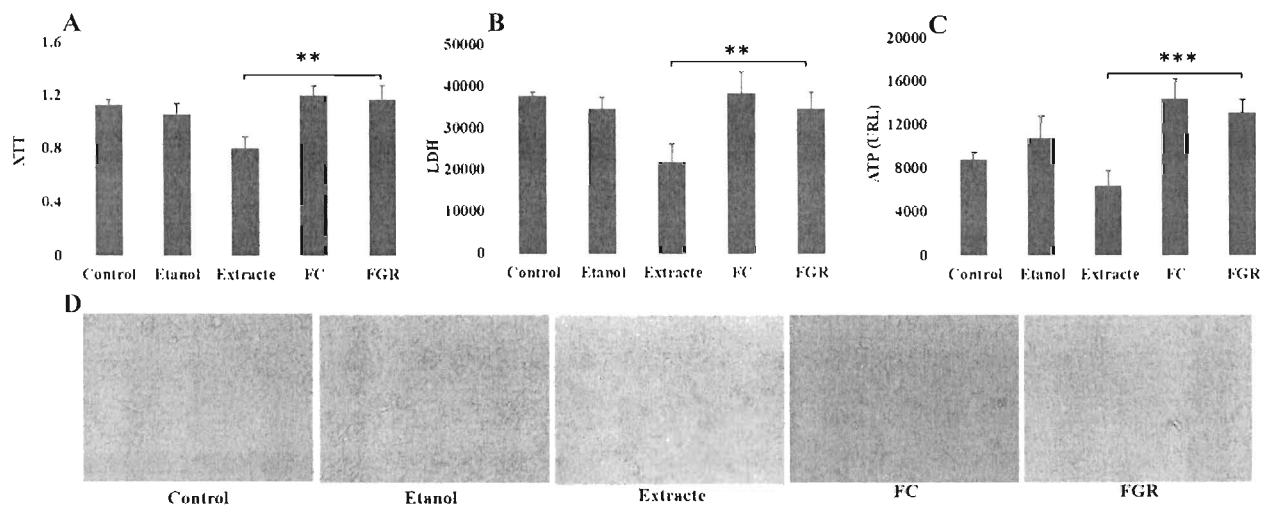


**Figura 10.** Tratarea șoarecilor C57Bl/6J cu FITOGINROSA (FGR) înainte de inducerea inflamației sistemice cu lipopolizaharide a contribuit la menținerea unui nivel normal al activității enzimei antioxidante paraoxonaza 1 (PON1) (A) și la scăderea factorului de necroză tumorală alfa (TNF $\alpha$ ) (B). Rezultatele sunt prezentate ca medie  $\pm$  SEM, \*p<0,05, \*\*p<0,01, FGR versus extractele hidroalcoolice.

## 6. Viabilitatea celulelor enterocite tratate cu FITOGINROSA

Întru-cât rezultatele au arătat că FITOGINROSA în raport masic 0,5:0,5:1 și concentrație 20  $\mu$ M echivalent 6-gingerol este varianta optimă pentru obținerea de efecte antioxidante și anti-inflamatoare în enterocite, am ales să verificăm efectul acestei doze asupra viabilității celulare. Am însămânțat celulele enterocite Caco2 la o densitate de 200.000/mL și le-am crescut în mediu MEM (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) suplimentat cu 10% ser fetal bovin, L-glutamină și un amestec de aminoacizi ne-esențiali. Celulele Caco2 au fost expuse la FITOGINROSA 20  $\mu$ M sau mix de extracte hidroalcoolice GINex:ROSAex (0,5:0,5) 20  $\mu$ M echivalent 6-gingerol. În paralel, am folosit drept control celule incubate cu FC sau etanol în concentrații echivalente celor din FITOGINROSA, respectiv din mix-ul de extracte hidroalcoolice. Efectul FITOGINROSA asupra viabilității celulare a fost evaluat folosind metoda XTT (Sigma

Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) sau kit-ul CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (Promega, Madison, USA). Metoda XTT este o metodă sensibilă folosită pentru determinarea viabilității celulare și se bazează pe măsurarea activității dehidrogenazelor mitocondriale din celulele vii care reduc sarea de tetrazoliu XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) determinând formarea formazanului solubil în apă, detectabil spectrofotometric. Kit-ul CytoTox-ONE folosește o metodă fluorimetrică rapidă pentru estimarea numărului de celule vii prin determinarea intracelulară a nivelurilor de lactat dehidrogenază (LDH). Rezultatele obținute prin ambele metode arată că FITOGINROSA în raport masic 0,5:0,5:1 și concentrație 20  $\mu\text{M}$  echivalent 6-gingerol nu prezintă efecte toxice asupra celulelor, spre deosebire de mix-ul de extracte hidroalcoolice care induce o scădere semnificativă a viabilității celulare (Figura 11A și 11B).



**Figura 11.** Viabilitatea celulelor enterocite după incubarea cu FITOGINROSA (FGR) prezentată comparativ cu expunerea celulelor la fosfatidilcolină (FC), mix-ul de extracte hidroalcoolice sau etanol și măsurată prin metoda XTT (A), activitatea lactat dehidrogenazei (B) și nivelul de ATP intracelular (C). \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  pentru FGR versus Extracte. (D) Imagini reprezentative de microscopie optică care evidențiază densitatea celulară în funcție de expunerea la mediu control, etanol, mix de extracte hidroalcoolice, FC sau FGR.

În paralel am evaluat statusul energetic al enterocitelor prin măsurarea nivelurilor intracelulare de ATP folosind kit-ul bioluminescent ViaLight Assay (Lonza, Rockland, ME, USA). Dacă viabilitatea celulelor expuse la FITOGINROSA se menține la nivelul celulelor control, măsurarea statusul energetic al enterocitelor incubate cu FITOGINROSA demonstrează efectul benefic al preparatului prin creșterea nivelului intracelular de ATP comparativ cu celulele expuse la extracte hidroalcoolice, dar și față de celulele control (Figura 11C). Rezultatele arată că

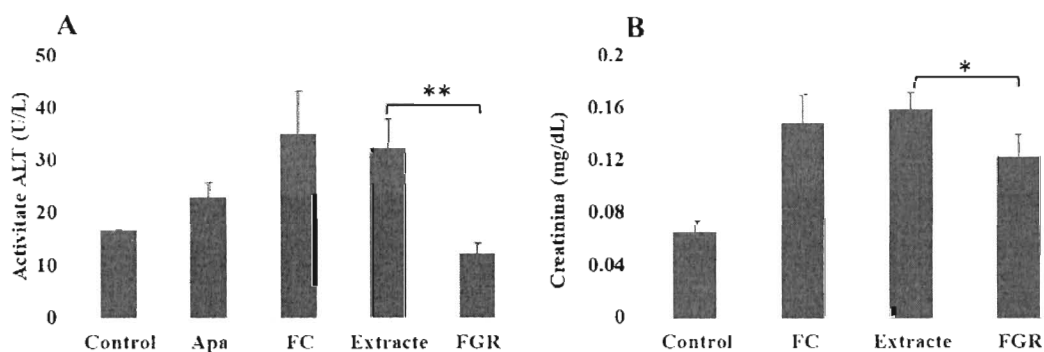
Alauca

Shul

formularea extractelor hidroalcoolice în fitozomi are efect protector pentru celulele enterocite, reducând efectul lor citotoxic.

### 7. Evaluarea toxicității FITOGINROSA *in vivo*

Pentru a evalua gradul de toxicitate al FITOGINROSA *in vivo* am măsurat activitatea alaninaminotransferazei (ALT) și nivelul de creatinină în plasma șoarecilor C57BL/6J care au primit tratament cu FITOGINROSA, amestec de extracte hidroalcoolice, FC sau apă administrat prin gavaj timp de 7 zile, apoi au fost injectați cu agentul pro-inflamator (LPS). Activitatea crescută în plasmă a ALT este un indicator al toxicității exercitate de un compus asupra țesutului hepatic, iar concentrația crescută de creatinină semnalează afectarea funcției țesutului renal [Schumann G și colab., 2002; Junge W și colab., 2004]. Pentru măsurarea activității ALT am utilizat o metodă care se bazează pe oxidarea NADH (kit Dialab, Neudorf, Austria), iar pentru cuantificarea nivelului de creatinină am folosit metoda Jaffé (kit Dialab, Neudorf, Austria). Măsurătorile au arătat că activitatea ALT în plasmă s-a dublat ca urmare a acțiunii LPS în cazul administrării de FC sau extracte hidroalcoolice, comparativ cu animalele Control. Administrarea prin gavaj a FITOGINROSA a menținut valoarea activității ALT la nivel normal, similar grupului Control (Figura 12A). Rezultate asemănătoare am obținut și în cazul creatininei a cărei concentrație plasmatică a crescut de 2,5 ori ca urmare a acțiunii LPS la șoarecii tratați cu FC sau amestecul de GINex și ROSAex. Administrarea în prealabil a FITOGINROSA a determinat reducerea cu 35% a nivelului plasmatic al creatininei comparativ cu extractele hidroalcoolice (Figura 12B).



**Figura 12.** Tratarea șoarecilor C57BI/6J cu FITOGINROSA (FGR) înainte de inducerea inflamației cu LPS a redus nivelurile plasmatiche de ALT (A) și creatinină (B) comparativ cu șoarecii care au primit fosfatidilcolina (FC), amestecul de extracte hidroalcoolice sau apă. Rezultatele sunt prezentate ca medie ± SEM, \*p<0,05, \*\*p<0,01, FGR versus extractele hidroalcoolice.

*Alman*

*Sergiu*

**Bibliografie**

1. Adel S, Prakash J. Chemical composition and antioxidant properties of ginger root (*Zingiber officinale*). *Journal of Medicinal Plant Research*. 4, 2674–2679, 2010.
2. Ain QU, Sarfraz M, Prasesti GK, Dewi TI, Kurniati NF. Confounders in Identification and Analysis of Inflammatory Biomarkers in Cardiovascular Diseases. *Biomolecules*. 11 (10): 1464, 2021.
3. Azzi A. Antioxidants: Wonder drugs or quackery? *Biofactors*. 43(6):785-788, 2017.
4. Barbalata T, Deleanu M, Carnuta MG, Niculescu LS, Raileanu M, Sima AV, Stancu CS. Hyperlipidemia determines dysfunctional HDL production and impedes cholesterol efflux in the small intestine; alleviation by ginger extract. *Molecular Nutrition and Food Research* 63(19), e1900029, 2019.
5. Carnuta MG, Deleanu M, Barbalata T, Toma L, Raileanu M, Sima AV, Stancu CS. *Zingiber officinale* extract administration diminishes steroyl-CoA desaturase gene expression and activity in hyperlipidemic hamster liver by reducing the oxidative and endoplasmic reticulum stress. *Phytomedicine* 48:62-69, 2018.
6. Cheng BCY, Fu XQ, Guo H, Li T, Wu ZZ, Chan K, Yu ZL. The genus *Rosa* and arthritis: Overview on pharmacological perspectives. *Pharmacological Research*, 114:219-234, 2016.
7. Chrubasik C, Duke RK, Chrubasik S. The evidence for clinical efficacy of rose hip and seed: a systematic review. *Phytotherapy Research*, 20(1):1-3, 2006.
8. Direito R, Reis C, Roque L, Gonçalves M, Sanches-Silva A, Gaspar MM, Pinto R, Rocha J, Sepodes B, Rosário Bronze M, Eduardo Figueira M. Phytosomes with Persimmon (*Diospyros kaki* L.) Extract: Preparation and Preliminary Demonstration of In Vivo Tolerability. *Pharmaceutics*. 11(6):296, 2019.
9. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circulation Research*. 122:877-902, 2018.
10. Fuior EV, Mocanu CA, Deleanu M, Voicu G, Anghelache M, Rebleanu D, Simionescu M, Calin M. Evaluation of VCAM-1 Targeted Naringenin/Indocyanine Green-Loaded Lipid Nanoemulsions as Theranostic Nanoplatfoms in Inflammation. *Pharmaceutics*. 12(11):1066, 2020.
11. Ghanbarzadeh B, Babazadeh A, Hamishehkar H. Nano-phytosome as a potential food-grade delivery system. *Food Bioscience*, 15, 126-135, 2016.
12. Hosseinzadeh A, Juybari KB, Fatemi MJ, Kamarul T, Bagheri A, Tekiyehmaroof N, Sharifi AM. Protective Effect of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) Extract against Oxidative Stress and Mitochondrial Apoptosis Induced by Interleukin-1 $\beta$  in Cultured Chondrocytes. *Cells Tissues Organs*, 204(5-6):241-250, 2017.
13. Hu CT, Shao YD, Liu YZ, Xiao X, Cheng ZB, Qu SL, Huang L, Zhang C. Oxidative stress in vascular calcification. *Clinica Chimica Acta*, 519:101-110, 2021.
14. Junge W, Wilke B, Halabi A, Klein G. Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffé method. *Clinica Chimica Acta*. 344(1-2):137-48, 2004.
15. Kim MG, Shin BS, Choi Y, Ryu JK, Shin SW, Choo HW, Yoo SD. Determination and pharmacokinetics of [6]-gingerol in mouse plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 26(5):660-5, 2012.
16. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X, Deng Y. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10 (2), 81-98, 2015.
17. Maloberti A, Vallerio P, Trigilione N, Occhi L, Panzeri F, Bassi I, Pansera F, Piccinelli E, Peretti A, Garatti L, Palazzini M, Sun J, Grasso E, Giannattasio C. Vascular Aging and Disease of the Large Vessels: Role of Inflammation. *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention*, 26(3):175-182, 2019.




18. Mao QQ, Xu XY, Cao SY, Gan RY, Corke H, Beta T, Li HB. Bioactive Compounds and Bioactivities of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Foods*, 8(6):185. 2019.
19. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Jiménez-Moreno N, Ancín-Azpilicueta C, Rodríguez-Yoldi MJ. Therapeutic Applications of Rose Hips from Different Rosa Species. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(6):1137, 2017.
20. Mohamed OI, El-Nahas AF, El-Sayed YS, Ashry KM. Ginger extract modulates Pb-induced hepatic oxidative stress and expression of antioxidant gene transcripts in rat liver, *Pharmaceutical Biology*, 54:7, 1164-1172, 2016.
21. Moyer MW. The myth of antioxidants. *Scientific American*, 308(2):62-7, 2013.
22. Nagendra chari KL, Manasa D, Srinivas P, Sowbhagya HB. Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Food Chem*. 139, 509–514, 2013.
23. Neha K, Haider R, Pathak A, Yar MS. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178:687-704, 2019.
24. Olives Barba AI, Camara Hurtado M, Sanchez Mata MC, Fernandez Ruiz V, Lopez M, Saenz de Tejada. Application of a UV–vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and  $\beta$ -carotene in vegetables *Food Chemistry* 95, 328–336, 2006.
25. Pisoschi AM, Pop A, Iordache F, Stanca L, Predoi G, Serban AI. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209:112891, 2021.
26. Qu X, Tang Y, Hua S. Immunological Approaches Towards Cancer and Inflammation: A Cross Talk. *Frontiers in Immunology*, 9:563, 2018.
27. Rozenberg O, Shih DM, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON1 transfected cells and in PON1 transgenic mice. *Atherosclerosis* 181, 9–18, 2005.
28. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Féraud G, Ferrero CA, Franck PF, Gella FJ, Hoelzel W, Jørgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kristiansen N, Lessinger JM, Linsinger TP, Misaki H, Panteghini M, Pauwels J, Schiele F, Schimmel HG, Weidemann G, Siekmann L; International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 40(7):718-24, 2002.
29. Srinivasan K. Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*): A spice with multiple health beneficial potentials. *PharmaNutrition* 5, 18–28, 2017.
30. Toma L, Raileanu M, Deleanu M, Stancu CS, Sima AV. Novel molecular mechanisms by which ginger extract reduces the inflammatory stress in TNF $\alpha$  – activated human endothelial cells; decrease of Ninjurin-1, TNFR1 and NADPH oxidase subunits expression. *Journal of Functional Foods* 48: 654-664, 2018.
31. Vona R, Gambardella L, Cittadini C, Straface E, Pietraforte D. Biomarkers of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome and Associated Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 8267234, 2019.
32. Zhao F, Guo L, Wang X, Zhang Y. Correlation of oxidative stress-related biomarkers with postmenopausal osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. *Archives of Osteoporosis*, 16(1):4, 2021.
33. Zhu J, Chen H, Song Z, Wang X, Sun Z. Effects of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on Type 2 Diabetes Mellitus and Components of the Metabolic Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5692962, 2018.



**Revendicări:**

1. Complexe moleculare fito-fosfolipidice, denumite fitozomi FITOGINROSA, formate prin reacția dintre compuși polifenolici din extracte din plante și gruparea fosfat sau trimetil amoniu a fosfatidilcolinei, **caracterizate prin aceea că** sunt constituite din 25% (procente masice) extract hidroalcoolic din rizomi de ghimbir liofilizat (GINex), 25% (procente masice) extract hidroalcoolic din fructe de măceș liofilizat (ROSAex) și fosfatidilcolină în proporție optimă de 50%, ce pot fi administrate pe cale orală, prezintă biodisponibilitate crescută și au rol antioxidant și anti-inflamator.
2. Procedeu de obținere a fitozomilor FITOGINROSA conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că**, extractul hidroalcoolic din rizomi de ghimbir liofilizat se combină cu extractul hidroalcoolic din fructe de măceș liofilizat în rapoarte masice 0,5:0,5, apoi sunt solubilizate în etanol absolut, la 60°C, sub agitare magnetică, până când se obține o suspensie omogenă peste care se adaugă încet, sub refluxare și agitare fosfatidilcolina în raport masic cu cele doua extracte de 0,5:0,5:1, solubilizată în etanol absolut și se lasă să reacționeze timp de 2 ore, la 60°C, iar după evaporarea etanolului, compusul rezultat de culoare portocalie este hidratat cu apă și timp de aproximativ 30 minute se sonichează pe baia de apă pentru ajustarea dimensiunii particulelor, până când se obține o nanoemulsie care este apoi liofilizată.
3. Fitozomi FITOGINROSA conform revendicărilor 1-2 **caracterizați prin aceea că**, în celulele enterocite activate cu TNF $\alpha$  ca moleculă inițiatoare a stresului oxidativ și inflamator a indus creșterea cu 60-90% a expresiei genice a enzimelor antioxidante superoxid dismutaza 2 și paraoxonaza 2 și a determinat scăderea cu 50% a expresiei genice a moleculei pro-inflamatorii interleukina 1 $\beta$ , comparativ cu TNF $\alpha$ , proprietăți antioxidante și anti-inflamatoare care au fost demonstrate și *in vivo*, la șoareci cu inflamație sistemică generată de lipopolizaharide la care administrarea fitozomilor au indus o creștere cu 30% a activității paraoxonazei 1 și o scădere cu 35% a TNF $\alpha$  în plasmă.
4. Fitozomi FITOGINROSA conform revendicărilor 1-3 **caracterizați prin aceea că** prezintă o biodisponibilitate crescută de 2-3 ori a principiilor active în plasma șoarecilor pe intervalul de timp 15 – 120 minute de la administrare și cu 50% la nivelul ficatului și rinichilor, în paralel cu scăderea cu 60% a concentrației acestora la nivelul stomacului, ceea ce sugerează o absorbție mai bună la nivelul tubului digestiv.
5. Fitozomi FITOGINROSA conform revendicărilor 1-4 **caracterizați prin aceea că** administrați în doză terapeutică de 4.5 mg 6-gingerol/kg corp, timp de 7 zile, la șoareci cu inflamație sistemică indusă de lipopolizaharide nu au avut efecte toxice, dimpotrivă, au indus o scădere cu 25% a concentrației plasmatice de creatinină și cu 60% a activității alaninaminotransferazei, ceea ce indică absența toxicității *in vivo*; nu prezintă efecte adverse nici în *in vitro* deoarece nu a indus citotoxicitate la nivelul celulelor enterocite, măsurată ca metabolizare a XTT, nivel al activității lactatdehidrogenazei sau al ATP intracelular.