



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2022 00628**

(22) Data de depozit: **13/10/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/04/2024 BOPI nr. **4/2024**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,**
ȘOS.PANDURI NR.90, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **MERNEA MARIA, STR.PREOT SEBE**
COSTIN, NR.27, DUDU, IF, RO;
• **STAN MIRUNA, STR. LACUL TEI NR. 113,**
BL. 6B, SC. 2, AP. 64, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **NICA CRISTINA, ALEEA BOTORANI,**
NR.4, BL.V82, SC.2, ET.7, AP.59,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;

• **NIȚU CRISTINA, STR. IZVORUL OLTULUI**
NR.9, BL.2, SC.2, ET.3, AP.87, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **MATANIE CRISTINA ALINA, STR. BABA**
NOVAC, NR.8A, BL.E, ET.6, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **AVRAM SPERANȚA, STR.OBCINA MARE,**
NR.9, BL.Z, ET.3, AP.26, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **STOIAN GHEORGHE,**
CALEA VACĂREȘTI NR.338, BL.15, SC.1,
ET.5, AP.17, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) **PROCEDEU DE SINTEZĂ A UNOR NANOPARTICULE
DE ZEINĂ ÎNCĂRCATE CU EXTRACT DE GHIMBIR CARE
PREZINTĂ POTENȚIAL TEREPEUTIC ANTITUMORAL**

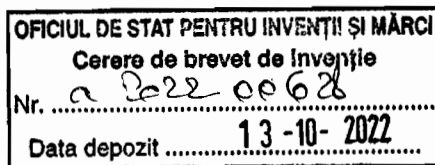
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor nanoparticule de zeină încărcate cu ghimbir tratat termic cu efect antitumoral pentru aplicații biomedicale. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: preparare extract de ghimbir (*Zingiber officinale* Rosc.) prin mojararea ghimbirului proaspăt, amestecare cu apă deionizată și tratarea pastei într-o autoclavă la temperatura de 120°C timp de 360 min, preparare amestec constituenți nanoparticule prin amestecarea zeinei cu deoxicolat de sodiu (SD) în etanol și extract de ghimbir

tratată termic, formare nanoparticule de zeină dopate cu ghimbir tratat termic pe baia de ultrasonicare, dializa suspensiei de nanoparticule și crioilizare, rezultând o pulbere de nanoparticule de zeină dopate cu extract de ghimbir tratat termic având efect antitumoral demonstrat *in vitro*.

Revendicări: 3
Figuri: 4





33

PROCEDEU DE SINTEZĂ A UNOR NANOPARTICULE DE ZEINĂ ÎNCĂRCATE CU EXTRACT DE GHIMBIR CARE PREZINTĂ POTENȚIAL TERAPEUTIC ANTITUMORAL

Descriere

Prezenta invenție se referă la un procedeu de sinteză a nanoparticulelor de zeină încărcate cu extract de ghimbir, nanoparticulele astfel obținute având efect antitumoral.

Nanoparticulele sunt sisteme populare de livrare țintită a medicamentelor datorită posibilității de control al dimensiunilor și al proprietăților suprafețelor, precum și a dinamicii de eliberare a medicamentului realizată de acestea ¹. În ultima perioadă, nanoparticulele polimerice sintetizate din proteine au câștigat o atenție sporită pentru că respectă aceste criterii, iar suplimentar sunt biocompatibile, biodegradabile și non-toxice ². Un exemplu de proteină utilizată pentru sinteza nanoparticulelor este zeina, o prolamină extrasă din semințele de porumb care este considerată sigură pentru administrare umană. Zeina este insolubilă în apă și solubilă în alcool, prezentând o tendință spre precipitare și agregare. Zeina poate forma nanoparticule care sunt bune candidate ca sisteme de transport de medicamente care realizează eliberarea controlată a acestora ³.

Ghimbirul (*Zingiber officinale* Rosc.), aparținând familiei subtropicale Zingiberaceae, este cunoscut pentru efectul antitumoral, fiind eficient și în cazul cancerului gastro-intestinal ⁴. Compușii activi ai acestei plante sunt reprezentați de terpene și compuși fenilici ⁵. Terpenele din ghimbir sunt zingiberene, β -bisabolene, α -farnesene, β -sesquiphellandrene și α -curcumene. Compușii fenilici sunt reprezentați de gingeroli, shogaoli și paradoli. Studiile anterioare au arătat că efectul antitumoral al ghimbirului poate fi mediat de 6-gingerol și 6-shogaol ⁴. Compusul 6-shogaol se obține prin extracție la temperatură mare și cantitatea în care este prezent se corelează pozitiv cu capacitatea anti-oxidantă a extractelor de ghimbir ⁶. Datorită biodisponibilității reduse a compusului 6-shogaol, cercetările recente vizează creșterea biodisponibilității prin încărcarea în agenți de livrare cum sunt micellele ⁷ sau nanoparticulele ⁸.

Prezenta invenție se referă la sinteza unor nanoparticule de zeină încărcate cu extract de ghimbir. Metoda de sinteză a acestora se bazează pe nanoprecipitarea zeinei în prezența deoxicolatului de sodiu (1.25% masă/volum) – conform metodei dezvoltate de Galiadi et. al. ⁹ și a unui extract de ghimbir. În prealabil, extractul de ghimbir a fost tratat termic cu scopul de a favoriza reacția de deshidratare a gingerolilor care conduce la formarea shogaolilor. Astfel am asigurat încărcarea nanoparticulelor cu un extract bogat în shogaoli. Nanoparticulele obținute au fost apoi supuse dializei pentru îndepărtarea compușilor nereacționați, iar ulterior au fost liofilizate în vederea stocării și utilizării lor.

Nanoparticulele sintetizate conform acestei invenții au fost caracterizate din punctul de vedere al proprietăților fizico-chimice, precum și din punctul de vedere al efectului biologic. Astfel am demonstrat prezenta polifenolilor în extractul de ghimbir pretrat termic, polifenoli care în proporție de ~11% se încarcă în nanoparticule. Proprietățile nanoparticulelor încărcate cu

ghimbir au fost comparate cu cele ale nanoparticulelor sintetizate urmând protocolul lui Galiadi et. al. ⁹ pentru a demonstra îmbunătățirea adusă de încărcarea cu ghimbir. Raza hidrodinamică a celor două tipuri de nanoparticule este comparabilă, însă semnătura în domeniul infraroșu a nanoparticulelor încărcate cu ghimbir este diferită. De asemenea, nanoparticulele încărcate cu ghimbir sunt cu 20% mai citotoxice asupra celulelor dintr-o linie de cancer de colon decât nanoparticulele fără ghimbir, ceea ce ar permite utilizarea unei cantități mai mici pentru a obține un efect biologic mai puternic.

Prezentarea invenției - procedeul de sinteză a nanoparticulelor

Procedeul de sinteză a nanoparticulelor a implicat următoarele etape:

1. *Preparare extract de ghimbir tratat termic* – 100 g ghimbir proaspăt a fost mojarat cu nisip de cuarț. Peste pastă s-au adăugat 300 ml apă deionizată și amestecul a fost autoclavat timp de 360 minute (temperatură de 120° C). Extractul de ghimbir a fost separat de resturile de ghimbir prin centrifugare.
2. *Preparare amestec constituenți nanoparticule* - 58 mg zeină au fost amestecate cu 221 mg deoxicolat de sodiu (SD) în 25 ml etanol 70% preparat din etanol 96% diluat cu cantitatea corespunzătoare de extract de ghimbir preparat termic.
3. *Formarea nanoparticulelor de zeină încărcate cu extract de ghimbir preparat termic* – pe baia de ultrasonicare se pune un tub cu 25 ml apă distilată. În tub se adaugă amestecul pentru nanoparticule prin picurare treptată timp de 50 minute. Tubul este lăsat peste noapte cu capacul deschis pe vortexul agitator pentru a favoriza evaporarea etanolului.
4. *Dializa suspensiei de nanoparticule* – suspensia rezultată se introduce într-un sac de dializă cu cut-off de masă moleculară de 50 kDa. Se realizează dializa timp de 24 ore față de apa deionizată pentru îndepărtarea compușilor nereacționați.
5. *Obținerea unei pulberi de nanoparticule* - conținutul săculețului de dializă se varsă într-un tub care se introduce în aparatul de crioliofilizare (vid, temperatură de -80° C).

Caracterizarea nanoparticulelor rezultate prin aplicarea invenției

În cadrul prezentei invenții, nanoparticulele de zeină încărcate cu extract de ghimbir preparat termic au fost caracterizate fizico-chimic după cum este prezentat mai jos. Proprietățile nanoparticulelor sintetizate conform invenției (încărcate cu extract de ghimbir) au fost comparate cu proprietățile unor nanoparticule de zeină sintetizate conform metodei lui Galiadi et. al. ⁹.

1. *Determinarea concentrației de polifenoli din extractul de ghimbir tratat termic și din nanoparticule*

1.1. *Determinarea conținutului de polifenoli din extractele de ghimbir*

Conținutul de polifenoli din extractul de ghimbir preparat termic a fost determinat aplicând metoda lui Wolfe et al.¹⁰. În 3 tuburi au fost pregătite diluții din extractul de ghimbir: 1, 1/10, 1/100. Peste cele 3 tuburi s-au adăugat 5 ml reactiv Folin-Ciocalteu diluat cu apă 1:10 v/v și 4 ml carbonat de sodiu 7,5%. Toate tuburile au fost vortexate pentru 15 secunde și incubate pentru 30 de minute pe baie de apă la temperatura de 40° C pentru stabilizarea culorii. Absorbanța probelor a fost măsurată la o lungime de undă de 765 nm folosind spectrofotometrul Specord Plus (Analytik Jena AG, Germania). Pentru determinarea concentrației s-a utilizat o curbă etalon obținută pentru acidul galic.

Astfel, în cazul extractului de ghimbir preparat termic am determinat o concentrație de 14.82 μg/ml echivalent acid galic.

1.2. *Determinarea concentrației de polifenoli din suspensiile de nanoparticule liofilizate*

Pentru determinarea concentrației de polifenoli din nanoparticule, pulberea de nanoparticule a fost solubilizată într-un amestec de cloroform: metanol 1/1 (v/v- 5 ml cloroform/ 5 ml metanol). Peste 10 mg nanoparticule au fost adăugate 200 μl din amestecul de cloroform : metanol 1:1. Acestea au fost așezate 10 minute pe baia de ultrasonicare, după care au fost centrifugate 5 minute la 14 000 rpm. După centrifugare, din tuburi s-a preluat 100 μl supernatant și s-a transferat în tuburi noi peste care au fost adăugați 0,5 ml reactiv Folin-Ciocalteu diluat cu apă 1:10 v/v și 0,4 ml carbonat de sodiu 7,5%. Toate tuburile au fost vortexate pentru 15 secunde și apoi incubate 30 de minute pe baie de apă la 40° C pentru stabilizarea culorii. Curba de calibrare a fost pregătită utilizând acid galic, iar absorbanța soluțiilor a fost măsurată la 765 nm utilizând spectrofotometrul Specord Plus (Analytik Jena AG, Germania).

În cazul nanoparticulelor încărcate cu extractul de ghimbir preparat termic regăsim o concentrație de 1.64 μg/ml echivalent acid galic, ceea ce reprezintă ~11 % din cea prezentă în extractul folosit la prepararea acestora.

2. *Determinarea razei hidrodinamice a nanoparticulelor*

Raza hidrodinamică și indicele de polidispersie a nanoparticulelor suspendate în apă la o concentrație de 0.05 mg/ml a fost determinată prin măsurători de de împrăștiere dinamică a luminii (dynamic light scattering - DLS) utilizând un echipament Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Parametrii măsurătorilor au fost: temperatură de 25° C, indice de refracție de 1.45 – corespunzător nanoparticulelor proteice și dispersantul utilizat – apă. Principiul DLS constă în măsurarea împrăștierii luminii de către particulele solide suspendate în

solventul ales, respectiv apa, aducând informații despre difuzia acestora. Pe baza proprietăților de difuzie se estimează dimensiunea aparentă a acestora în apă. Rezultă o distribuție de dimensiuni, însă se raportează raza medie a particulelor în apă (raza hidrodinamică). Deviația de la raza medie se estimează sub forma indicelui de polidispersie (PDI).

În cazul nanoparticulelor de zeină încărcate cu ghimbir preparat termic am obținut o dimensiune medie de 460.3 nm și un indice de polidispersie de 0.797, ceea ce sugerează existența unei distribuții neomogene a dimensiunilor particulelor. La analiza distribuției dimensiunilor nanoparticulelor în funcție de intensitatea de împrăștiere a luminii (Fig. 1), am observat existența a două populații de particule. Prima populație cuprinde 73.1% din particulele din probă, având o dimensiune medie de 224.2 nm. Cea de-a doua populație, care cuprinde 26.9 % din particulele analizate, este caracterizată de o dimensiune medie de 5137 nm și cuprinde macroagregate (dimensiuni > 1000 nm). Considerând doar prima populație de nanoparticule, raza hidrodinamică a nanoparticulelor cu ghimbir preparat termic este apropiată de cea a nanoparticulelor de zeină, respectiv 225.8 nm.

3. *Compoziția calitativă a nanoparticulelor (spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier).*

Pentru caracterizarea nanoparticulelor am utilizat spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR), măsurătorile fiind realizate cu spectrofotometrul Bruker Tensor 27 (Bruker, Germania). Spectrele au fost măsurate la un intervalul de frecvențe de 4000- 400 cm^{-1} la o rezoluție de 4 cm^{-1} . Măsurarea spectrului de absorbție a probelor implică realizarea a două determinări: referința (spectrul măsurat în absența probei) și spectrul probei (nanoparticule de zeină încărcate cu extract de ghimbir preparat termic sau nanoparticule de zeină).

Spectrele FTIR înregistrate pe componentele nanoparticulelor, respectiv zeina pură, deoxicolatul de sodiu, precum și spectrele înregistrate pe nanoparticulele de zeină și nanoparticulele încărcate cu ghimbir tratat termic sunt prezentate în Fig. 2. Spectrul zeinei prezintă benzile de absorbție specifice proteinelor: (a) banda amidă I care reflectă în principal mișcările de întindere dintre legăturile C=O (70-85%) și legăturile C-N (10-20%), este centrată în jurul frecvenței de 1640 cm^{-1} , (b) banda amidă II datorită întinderii în plan a legăturilor N-H și C-N, centrată în jurul frecvenței de 1523 cm^{-1} și (c) banda amidă A datorată mișcărilor de întindere între legăturile N-H este centrată în jurul frecvenței de 3287 cm^{-1} . Deoxicolatul de sodiu prezintă maxime de absorbție la frecvențele de 1040, 1392, 1560, 2865, 2929 cm^{-1} , precum și o bandă largă centrată în jurul frecvenței de 3291 cm^{-1} .

În spectrul nanoparticulelor de zeină regăsim benzile amidă ale proteinei, dar și contribuția deoxicolatului de sodiu. În comparație cu zeina pură, observăm o shiftare a maximului corespunzător benzii amida II de la 1523 cm^{-1} la 1547 cm^{-1} datorită interacțiunii cu deoxicolatul de sodiu care de asemenea prezintă o bandă centrată în jurul a 1560 cm^{-1} . Tot datorită contribuției deoxicolatului de sodiu observăm o schimbare a raportului benzilor amidă I și II. În cazul zeinei pure, amplitudinea benzii amidă I este mai mare decât cea a benzii amidă II,

Însă în cazul nanoparticulelor de zeină, banza amida II este mai amplă decât amida I. În spectrul nanoparticulelor de zeină putem observa contribuția deoxicolatului de sodiu sub forma maximelor de absorbție la 1040, 1392, 2865 și 2929 cm^{-1} . Aceste maxime de absorbție nu au corespondență în spectrul zeinei pure, cu excepția maximului de la 2924 cm^{-1} , care în cazul zeinei pure prezintă o amplitudine mică. Banda centrată în jurul valorii de 1040 cm^{-1} este specifică deoxicolatului de sodiu și nu are corespondență în spectrul zeinei.

În cazul nanoparticulelor încărcate cu ghimbir preparat termic putem observa că spectrul este complet diferit de cel al nanoparticulelor de zeină. În cazul acestui spectru regăsim banda amidă I datorată zeinei, însă acesta are o amplitudine mică, în timp ce banda amidă II este insesizabilă. De asemenea, nu regăsim maximele datorate deoxicolatului de sodiu. Spectrul este dominat de un maxim la 1015 cm^{-1} , o frecvență apropiată de 1040 cm^{-1} , acolo unde deoxicolatul de sodiu prezintă o absorbție specifică. Putem presupune că la acest maxim contribuie deoxicolatul de sodiu din compoziția nanoparticulelor la care se adaugă contribuția compușilor din extractul de ghimbir. Forma spectrului nanoparticulelor încărcate cu ghimbir preparat termic arată că acestea prezintă o compoziție particulară asociată cu interacțiuni particulare între componentele sale.

Testarea efectului antitumoral al nanoparticulelor obținute prin aplicarea invenției

În cadrul prezentei invenții, efectul biologic al nanoparticulele de zeină încărcate cu extract de ghimbir preparat termic a fost testat asupra liniei celulare Caco-2, clona C2BBel. În Tabelul 1 este prezentată originea acestei linii celulare utilizată pentru observarea efectului biologic al nanoparticulelor de zeină dopate cu ghimbir.

Tabel 1. Caracteristicile liniei celulare Caco-2, clona C2BBel.

Organism de origine	<i>Homo sapiens</i> (om)
Tipul de țesut	Colon
Tipul celulelor	Enterocite
Morfologia țesutului	Țesut epitelial
Sexul pacientului	Masculin
Vârsta	72 ani
Maladia	Adenocarcinom colorectal
Etnia	Caucazian

Testarea efectului nanoparticulelor de zeină încărcate cu ghimbir preparat termic și a nanoparticulelor de zeină s-a realizat în placi cu 24 godeuri, în fiecare godeu fiind cultivate

celule la o densitate de 2×10^5 celule / godeu. Au fost testate concentrațiile de 100, 200 și 500 $\mu\text{g/ml}$ nanoparticule. Efectul asupra celulelor a fost evaluat după 48 ore de incubare cu nanoparticule prin determinarea viabilității – testul MTT și a producției de oxid nitric – metoda colorimetrică Griess.

1. Viabilitatea celulelor tratate cu nanoparticule

Viabilitatea celulelor Caco-2 a fost testată în prezența nanoparticulelor de zeină și a celor de zeină încărcate cu extract de ghimbir. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2 și Fig. 3. Se poate observa că atât nanoparticulele de zeină, cât și cele încărcate cu ghimbir, prezintă un efect citotoxic. Nanoparticulele de zeină aplicate celulelor Caco-2 reduc viabilitatea până la ~26% la utilizarea unei concentrații de 500 $\mu\text{g/ml}$ nanoparticule. Efectul de scădere al viabilității celulare datorat nanoparticulelor de zeină preparate cu deoxicolat de sodiu a fost evidențiat de Gagliardi A. et al. utilizând celule A549 (celule umane – cancer de plămâni) și K562 (celule umane – leucemie mielogenă cronică), arătând că după 48 de ore de incubare, viabilitatea celulară scade până la ~40% pentru o doză de 100 $\mu\text{g/ml}$ nanoparticule ⁹. Experimentele realizate aici arată că doza de 100 $\mu\text{g/ml}$ este mai puțin citotoxică pentru celulele Caco-2 decât în cazul celulelor A549 și K562.

În ceea ce privește efectul nanoparticulelor de zeină încărcate cu ghimbir tratat termic, observăm un efect citotoxic mai pronunțat la toate dozele considerate (viabilitate de ~15% la aplicarea a 500 $\mu\text{g/ml}$ nanoparticule încărcate cu extract de ghimbir). Efectul citotoxic este mai puternic decât cel observat în cazul nanoparticulelor de zeină fără ghimbir. Astfel, la aplicarea a 100 $\mu\text{g/ml}$ observăm o scădere a viabilității cu ~22% față de tratamentul cu nanoparticule de zeină fără ghimbir. La tratamentul cu 200 $\mu\text{g/ml}$, contribuția extractului de ghimbir se reflectă într-o scădere a viabilității cu ~24% față de tratamentul cu nanoparticule fără ghimbir, iar la 500 $\mu\text{g/ml}$ nanoparticule, viabilitatea scade cu ~11% față de situația în care celulele au fost tratate cu nanoparticule fără ghimbir. Astfel, putem afirma că încărcarea nanoparticulelor cu ghimbir le-a crescut citotoxicitatea, ceea ce ar permite aplicarea unor doze mai mici cu eficiență mai mare.

Tabelul 2. Viabilitățile celulare și deviațiile standard determinate în cazul tratamentului celulelor Caco-2 cu nanoparticule de zeină și cu nanoparticule de zeină încărcate cu extract de ghimbir preparat termic.

Concentrația NP ($\mu\text{g/ml}$)	Viabilitate celule (%) NP Zeină	Deviația standard	Viabilitate celule (%) NP Zeină+Ghimbir tratat termic	Deviația standard
0	100	3,16335	100	3,16335
100	82,87	0,80905	61,03127	2,40108
200	72,42715	2,38851	48,40084	3,90875
500	25,95728	2,98305	15,1734	2,7459

2. Producția de oxid nitric în celulele tratate cu nanoparticule

Pentru a identifica tipul de stress indus de nanoparticule asupra celulelor, am determinat producția de oxid nitric (NO) rezultată ca urmare a tratamentului cu cele două tipuri de nanoparticule – nanoparticule de zeină și nanoparticule de zeină încărcate cu ghimbir tratat termic. Rezultatele obținute sunt prezentate în Fig. 4. Am considerat producția de NO realizată de celulele control ca fiind 100%, iar producția realizată de celulele tratate cu nanoparticule a fost raportată la control.

Deși nanoparticulele de zeină încărcate cu ghimbir preparat termic și cele fără ghimbir sunt citotoxice, acestea nu cresc producția de oxid nitric. Astfel, nanoparticulele nu induc inflamație, ceea ce sugerează că își exercită efectul citotoxic prin alte mecanisme.

Referinte

1. Yao, Y. *et al.* Nanoparticle-Based Drug Delivery in Cancer Therapy and Its Role in Overcoming Drug Resistance. *Front. Mol. Biosci.* **7**, 193 (2020).
2. Habibi, N., Mauser, A., Ko, Y. & Lahann, J. Protein Nanoparticles: Uniting the Power of Proteins with Engineering Design Approaches. *Adv. Sci.* **9**, 2104012 (2022).
3. Pascoli, M., de Lima, R. & Fraceto, L. F. Zein nanoparticles and strategies to improve colloidal stability: A mini-review. *Front. Chem.* **6**, 6 (2018).
4. Prasad, S. & Tyagi, A. K. Ginger and Its Constituents: Role in Prevention and Treatment of Gastrointestinal Cancer. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2015**, (2015).
5. Grzanna, R., Lindmark, L. & Frondoza, C. G. Ginger--an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. *J. Med. Food* **8**, 125–132 (2005).
6. Ko, M. J., Nam, H. H. & Chung, M. S. Conversion of 6-gingerol to 6-shogaol in ginger (*Zingiber officinale*) pulp and peel during subcritical water extraction. *Food Chem.* **270**, 149–155 (2019).
7. Zhang, H. *et al.* Enhanced Oral Bioavailability, Anti-Tumor Activity and Hepatoprotective Effect of 6-Shogaol Loaded in a Type of Novel Micelles of Polyethylene Glycol and Linoleic Acid Conjugate. *Pharmaceutics* **11**, (2019).
8. Yang, C., Zhang, M., Lama, S., Wang, L. & Merlin, D. Natural-lipid nanoparticle-based therapeutic approach to deliver 6-shogaol and its metabolites M2 and M13 to the colon to treat ulcerative colitis. *J. Control. Release* **323**, 293–310 (2020).
9. Gagliardi, A. *et al.* Sodium deoxycholate-decorated zein nanoparticles for a stable colloidal drug delivery system. *Int. J. Nanomedicine* **13**, 601–614 (2018).
10. Wolfe, K., Wu, X. & Liu, R. H. Antioxidant Activity of Apple Peels. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 609–614 (2003).

Revendicări

1. Procedeu de sinteză a nanoparticulelor de zeină încărcate cu extract de ghimbir preparat termic, caracterizat prin aceea că va cuprinde următoarele etape:
 - a. *Preparare extract de ghimbir tratat termic* – 100 g ghimbir proaspăt se mojarază cu nisip de cuarț. Peste pastă se adăugă 300 ml apă deionizată și amestecul se autoclavează timp de 360 minute (temperatură de 120° C). Extractul de ghimbir se separă de resturile de ghimbir prin centrifugare.
 - b. *Preparare amestec constituenți nanoparticule* - 58 mg zeină se amestecă cu 221 mg deoxicolat de sodiu (SD) în 25 ml etanol 70% preparat din etanol 96% diluat cu cantitatea corespunzătoare de extract de ghimbir preparat termic.
 - c. *Formarea nanoparticulelor de zeină încărcate cu extract de ghimbir preparat termic* – pe baia de ultrasonicare se pune un tub cu 25 ml apă distilată. În tub se adaugă amestecul pentru nanoparticule prin picurare timp de 50 minute. Tubul se lasă peste noapte cu capacul deschis pe vortexul agitator pentru a favoriza evaporarea etanolului.
 - d. *Dializa suspensiei de nanoparticule* – suspensia rezultată se introduce într-un sac de dializă cu cut-off de masă moleculară de 50 kDa. Se realizează dializa timp de 24 ore față de apă deionizată pentru îndepărtarea compușilor nereacționați.
 - e. *Obținerea unei pulberi de nanoparticule* - conținutul săculețului de dializă se varsă într-un tub care se introduce în aparatul de criolifilizare care asigură un mediu de vid, la temperatură de -80° C.
2. Figurile 1-4 caracterizate prin aceea că sunt obținute în urma cercetărilor întreprinse pentru caracterizarea produșilor rezultați prin aplicarea metodei și demonstrează veridicitatea acesteia;
3. Aplicabilitatea caracterizată prin aceea că nanoparticulele pot fi utilizate pentru aplicații biomedicale, având efect antitumoral demonstrat in vitro.

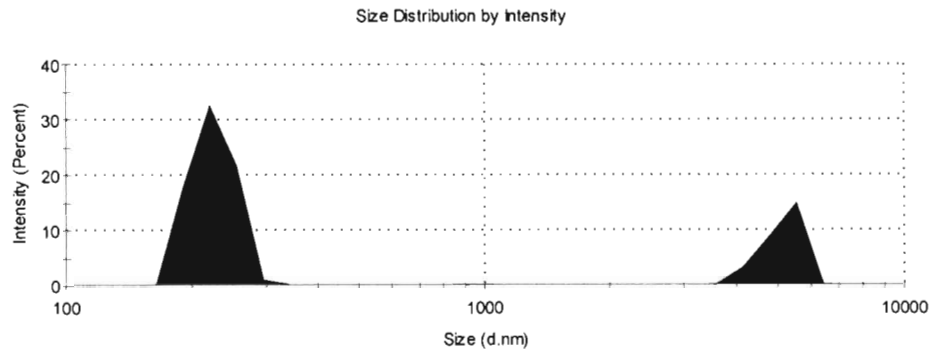


Fig. 1. Intensitatea de împrăștiere a luminii în funcție de dimensiunea nanoparticulelor determinată în cazul nanoparticulelor de zeină încărcate cu extract de ghimbir preparat termic.

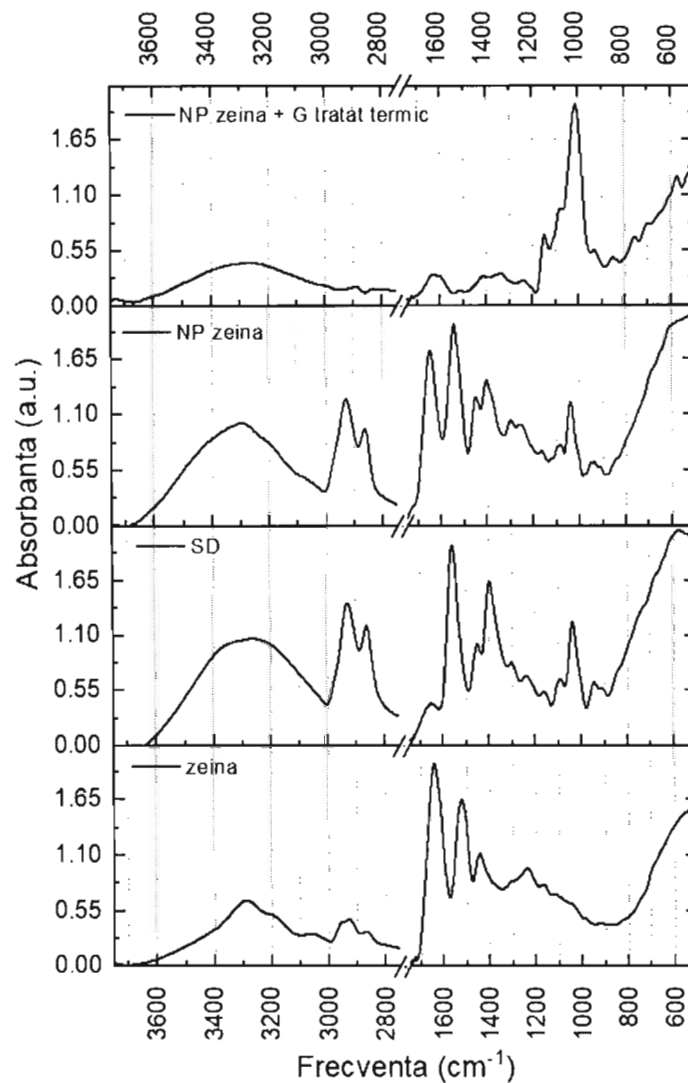


Fig. 2. Spectrele FTIR măsurate pentru probe de zeină, deoxicolat de sodiu (SD), nanoparticule de zeină (NP zeina) și nanoparticule de zeină încărcate cu ghimbir tratat termic (NP zeina + G tratat termic). Spectrele au fost normalizate la absorbanta maximă din intervalul 1700 – 900 cm^{-1} .

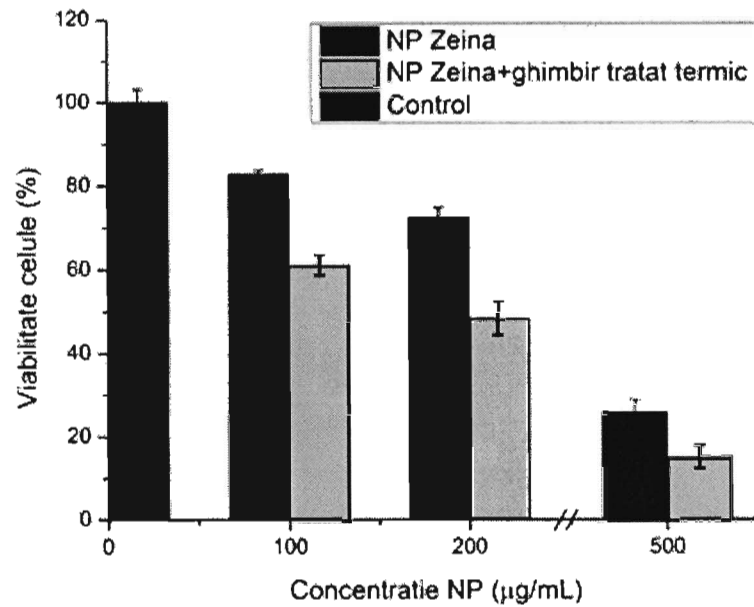


Fig. 3. Viabilitatea celulelor Caco-2 tratate cu 100, 200 și 500 µg/ml nanoparticule de zeină și nanoparticule de zeină încărcate cu extract de ghimbir preparat termic. Controlul a fost reprezentat de celule care nu au fost tratate cu nanoparticule.

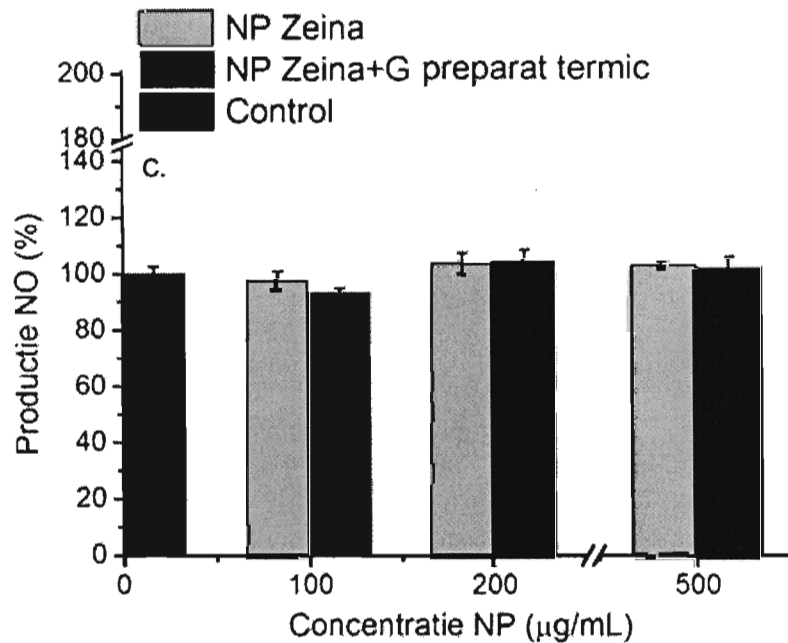


Fig. 4. Producția de oxid nitric (NO) măsurată în procente din producția de NO a celulelor de control determinată în cazul celulelor Caco-2 tratate cu nanoparticule de zeină (NP Zeina), nanoparticule de zeină încărcate cu ghimbir preparat termic (NP Zeina + G preparat termic).