



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00937

(22) Data de depozit: 22/11/2018

(41) Data publicării cererii:  
29/05/2020 BOPI nr. 5/2020

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
ȘTIINȚE BIOLOGICE,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• CRĂCIUNESCU OANA,  
BD. NICOLAE GRIGORESCU NR.33, BL.A 1,  
SC.3, AP.33, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;

• GASPĂR PINTILIESCU ALEXANDRA,  
ȘOS. COLENTINA NR. 55, BL. 83, SC. 1,  
AP. 17, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;  
• ȘTEFAN LAURA MIHAELA,  
STR. DEALUL ȚUGULEA NR. 54, BL. B9,  
SC. A, AP. 26, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• OANCEA ANCA OLGUȚA, STR. PAȘCANI  
NR. 5, BL. D7, SC. E, AP. 45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) COMPOZIȚIE FOTOPROTECTOARE DIN OLIGOPEPTIDE  
BIOACTIVE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei compoziții biostimulatoare pentru procesele de anti-îmbătrânire, fotoprotecția și hidratarea pielii. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de preparare a unui omogenat din resturi de pește și apă, încălzirea amestecului pentru inactivarea enzimelor endogene, centrifugare pentru îndepărtarea stratului lipidic, trata-

rea masei solide cu proteaze la temperaturi ridicate, ultrafiltrarea prin filtre pentru 1000 Da și liofilizare, rezultând o compoziție având un conținut de minimum 85% oligopeptide bioactive.

Revendicări: 1



## COMPOZIȚIE FOTOPROTECTOARE DIN OLIGOPEPTIDE BIOACTIVE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

**Autori:** Oana Crăciunescu, Alexandra Gaspar-Pintiliescu, Laura Mihaela Ștefan, Anca Olguța Oancea

Prezenta invenție se referă la o compoziție biostimulatoare pe baza de oligopeptide obținute din deseuri de peste (solzi, oase, etc) și ultrafiltrare, cu rol în protecția eficientă a pielii împotriva acțiunii radiațiilor UV.

Se cunoaște că peptidele naturale obținute din diferite surse prezintă acțiune stimulantă asupra creșterii celulelor (Schagen SK, *Cosmetics*, 2017, 4, 16; Pai VV et al., *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2017, 83, 9), sunt implicate în sinteza de matrice extracelulară (Rahnamaeian M & Vilcinskas A, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99, 8847), reducerea ridurilor și îmbunătățirea elasticității pielii. Peptidele bioactive din surse acvatice prezintă activitate antioxidantă (Sila A & Bougatef A, *J Funct Foods*, 2016, 21, 10), activitate anti-fotoîmbătrânire și de regenerare a țesutului (Ngo D-H et al., *J Funct Foods*, 2010, 2, 107), reduc sinteza de melanină (Schurink M et al., *Peptides*, 2007, 28, 485) și au acțiune asupra metaloproteinazelor matriceale (Hayashi Y et al., *In Advances in Food and Nutrition Research*, Kim SK (ed), Academic Press, USA, vol. 65, pp. 107, 2006). Mai multe tipuri de produse anti-îmbătrânire, antirid și de îngrijire a pielii, pe baza de peptide bioactive din peste s-au dezvoltat sau sunt în stadiul experimental. Deși prezintă un potențial de piață ridicat, acestea trebuie investigate din punct de vedere al stabilității formulărilor și al efectelor pe termen lung, pentru a asigura comercializarea lor cu succes.

Procesarea și comercializarea a milioane de tone de peste pentru consum uman produc mai mult de 60% din biomasă de produse secundare cum ar fi solzi, cap, oase cu resturi de carne, aripioare, piele, viscere. În literatura de specialitate, au fost identificate posibilități de valorificare a acestor produse secundare bogate în substanțe proteice, și anume: utilizarea proteinelor rezultate din procesarea tradițională a peștelui, producerea de materiale de tip surimi; și separarea de peptide bioactive pentru dezvoltarea de produse cosmetice și farmaceutice. În vederea

obținerii de hidrolizate proteice bogate în peptide bioactive din subproduse de pește se folosesc procedee de hidroliza chimică sau enzimatică, pentru care pot fi utilizate proteaze comerciale, precum: alcalaza, papaina, bromelaina, pepsina, tripsina,  $\alpha$ -chymotripsina, pancreatina, proteaza din *Aspergillus oryzae* (flavourzyme), proteaza din *Bacillus sp.* (protamex), pronaza, neutraza, termolizina, etc.

Pielea este formată din trei straturi diferite, epiderma, derma și hipoderma, care acționează ca o barieră pentru a proteja organismul împotriva agenților poluanți externi, de tipul agenți chimici, expunere la radiații UV și schimbări de temperatură. Iradierea UV, în special cu radiații din domeniul UV-B (320-290 nm) conduce la fotoîmbătrânirea și inflamarea pielii sau, în unele cazuri, chiar la cancer de piele. S-a demonstrat că hidrolizatele colagenice obținute din meduze pot stimula, la nivel celular, sistemul de apărare antioxidant, format din enzimele superoxid dismutază și glutatión peroxidază, care este atacat de iradierea cu UV (Zhuang Y et al., *J Food Sci*, 2009, 74, H183). La nivelul pielii de soarece iradiată UV și tratată cu hidrolizat de colagen din meduze, s-a raportat capacitatea de reparare a colagenului și elastinei endogene, dar și un rol important în îmbunătățirea sistemului imunitar *in vivo* (Fan J et al., *Nutrients*, 2013, 5, 223). Alte studii *in vivo* au demonstrat că fracții polipeptidice colagenice cu masă moleculară mai mică de 2000 Da, izolate din piele de cod au fost eficiente în prevenirea distrugerii structurilor din piele și a formării ridurilor sub acțiunea iradierii UV, prin menținerea umidității și grasimilor (Hou H et al., *Food Chem*, 2012, 135, 1432). Administrarea orală de hidrolizat de gelatină de cod a oprit distrugerea pielii prin iradiere UV deoarece a inhibat suprimarea activității enzimelor antioxidante endogene și exprimarea factorului nuclear NF- $\kappa$ B care mediază expresia citokinelor proinflamatoare (Chen T & Hou H, *J Photochem Photobiol B Biol*, 2016, 162, 633). Modificările legate de vârstă la nivelul pielii și datorate scaderii conținutului de colagen au fost împiedicate printr-un tratament cu un amestec de peptide colagenice și vitamina C, care a redus activitatea superoxid dismutazei, a îndus migrarea și proliferarea fibroblastelor măbind sinteza de colagen tip I *in vivo* la soareci (Shibuya S et al., *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, 78, 1212).

Au fost descrise diferite compoziții conținând peptide bioactive din diferite subproduse rezultate prin procesarea pestelui pentru consum uman. Astfel, brevetul US 2017/0087220 A1 din 30 martie 2017 se referă la o compoziție de vitamina C naturală și peptide obținute din solzi de pește, cu efect terapeutic, care indică un rol important al peptidelor în protejarea vitaminei C

naturale impotriva oxidarii si descompunerii. Brevetul CN 103849671 (B) din 6 ianuarie 2016 descrie o metoda de preparare a peptidelor bioactive prin enzimoliza subproduselor bogate in proteine, de tip coada sau cap de peste, rezultate la fabricarea de conserve de macrou pentru protejarea mediului si valorificarea superioara a deseurilor. Cererea de brevet CN 108103131(A) din decembrie 2017 protejeaza o metoda de combinare a acidolizei cu enzimoliza pentru obtinerea unei pudre de oligopeptide din piele de peste marin cu aplicatii in domeniul alimentar (suplimente, vin, sucuri) sau cel de ingrijire a sanatatii (tablete, capsule).

Problema tehnica pe care aceasta inventie urmareste sa o rezolve consta in obtinerea unei compozitii biostimulatoare din oligopeptide de peste, eficienta in fotoprotectie, procesele anti-imbatrănire si hidratarea pielii. In plus, contribuie la atenuarea poluarii mediului cu deseuri generate de industria procesatoare de peste.

Procedeul de preparare al compozitiei fotoprotectoare, conform inventiei, consta in obtinerea unei paste prin amestecarea de 100...500 g resturi de peste, alese dintre solzi, oase, carne, cu 200...1000 ml apa distilata rece, intr-un omogenizator cu cutite, la 1000 rpm, timp de 15 minute, decalcifiere prin tratare de 3 ori cu o solutie Tris-HCl 0,05 M continand 1% sare tetrasodica a acidului etilendiaminotetraacetic (EDTA), timp de 8 ore, incalzirea amestecului in baie de apa, timp de 5...15 min pentru inactivarea enzimelor endogene si separarea grasimilor, racire la temperatura camerei, centrifugarea la 10000 g, timp de 30 minute, indepartarea mecanica a stratului lipidic de la suprafata, recoltarea masei solide, tratarea cu proteaze, alese dintre papaina, bromelaina, pancreatin, chimotripsina, in raport de greutate substrat:enzima de 1:50, dizolvate in 2...5 volume tampon Tris-HCl 0,05M, pH 6...8, la 40...70 °C, timp de 2...8 h, stoparea reactiei prin fierbere 5...10 minute, racire, centrifugare la 8000 g, timp de 20 de minute, ultrafiltrare prin unitati pentru 1000 Da si liofilizarea filtratului, rezultand, in final, o pulbere alba-galbuie, cu un continut de minim 85% oligopeptide cu masa moleculara mai mica de 1000 Da.

Compozitia fotoprotectoare, obtinuta in conformitate cu prezenta inventie, prezinta urmatoarele avantaje:

- este eficienta in activitatea de neutralizare a radicalilor liberi formati prin iradiere UV;
- contine secvente omoloage cu proteinele din pielea umana;
- are o solubilitate ridicata si prezinta o absorbtie buna la nivelul pielii;
- este biocompatibila si prezinta activitate biologica de radioprotectie a tesutului dermic;

- procedeul de obtinere a compozitiei biostimulante este simplu si fezabil.

In continuare, se prezinta un exemplu de realizare a inventiei.

**Exemplul 1.** Intr-un vas de inox prevazut cu agitator cu cutite s-au introdus 100 g solzi de peste fitofag care au fost spalati, in prealabil, cu apa in flux continuu, timp de 1 ora. Peste acestia s-au adaugat 200 ml apa distilata si s-au amestecat la 1000 rpm, timp de 15 minute. Pasta rezultata a fost introdusa intr-un vas de sticla prevazut cu agitare si a fost amestecata cu o solutie de TrisHCl 0,05 M continand 1% sare tetrasodica a acidului etilendiaminotetraacetic (EDTA), timp de 8 ore, la temperatura camerei. Dupa filtrare, procedeul s-a repetat de 2 ori. Amestecul obtinut a fost incalzit intr-o baie de apa cu agitare, timp de 10 minute, dupa care a fost racit la temperatura camerei si centrifugat la 10000 g, timp de 20 de minute. S-au obtinut astfel 3 straturi, dintre care stratul lipidic de la suprafata a fost indepartat cu o spatula, stratul lichid a fost indepartat, iar masa solida a fost transferata intr-un alt vas rezistent la tratament termic. Peste 100 g masa solida decalcifiata s-au adaugat, sub agitare continua, 200 ml tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 6,5 in care s-au dizolvat, in prealabil, 0,2 g papaina. Vasul a fost introdus intr-o baie de apa cu temperatura controlata la 65 °C, timp de 4 ore. Hidroliza enzimatica a fost stopata prin fierbere timp de 10 minute, dupa care vasul a fost scos din baia de apa si racit la temperatura camerei. Hidrolizatul a fost centrifugat la 8000g, timp de 20 de minute, iar supernatantul a fost concentrat prin ultrafiltrare in unitati de filtrare cu cut-off 1000 Da. Filtratul obtinut cu concentratia de 2,2% a fost liofilizat. In final, s-a obtinut o pulbere alb-galbuie cu un continut in oligopeptide de 87%, solubila in mediu apos.

Compozitia biostimulatoare obtinuta conform exemplului a fost evaluata din punct de vedere radioprotector intr-o cultura de fibroblaste dermale supusa iradierii UV. Rezultatele testarii *in vitro* au demonstrat ca pretratarea celulelor fibroblaste cu oligopeptide din peste permite mentinerea viabilitatii si morfologiei celulelor, dupa iradierea UV, comparativ cu celulele netratate cu produsul obtinut, considerate ca martor.

## Revendicare

Procedeeul de preparare a compozitiei fotoprotectoare, conform inventiei, consta in obtinerea unei paste prin amestecarea de 100...500 g resturi de peste, alese dintre solzi, oase, carne, cu 200...1000 ml apa distilata rece, intr-un omogenizator cu cutite, la 1000 rpm, timp de 15 minute, decalcifiere prin tratare de 3 ori cu o solutie Tris-HCl 0,05 M continand 1% sare tetrasodica a acidului etilendiaminotetraacetic (EDTA), timp de 8 ore, incalzirea omogenatului in baie de apa, timp de 5...15 min pentru inactivarea enzimelor endogene si separarea grasimilor, racire la temperatura camerei, centrifugarea la 10000 g, timp de 30 minute, indepartarea mecanica a stratului lipidic de la suprafata, recoltarea masei solide, tratarea cu proteaze, alese dintre papaina, bromelaina, pancreatin,  $\alpha$ -chymotripsina, in raport de greutate substrat:enzima de 1:50, dizolvate in 2...5 volume tampon Tris-HCl 0,05M, pH 6...8, la 40...70 °C, timp de 2...8 h, stoparea reactiei prin fierbere 5...10 minute, racire, centrifugare la 8000 g, timp de 20 de minute, ultrafiltrare prin unitati pentru 1000 Da si liofilizarea filtratului, rezultand, in final, o pulbere alb-galbuie, cu un continut de minim 85% oligopeptide cu masa moleculara mai mica de 1000 Da.