



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00782

(22) Data de depozit: 29/11/2022

(41) Data publicării cererii:
30/03/2023 BOPI nr. 3/2023

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE TEXTILE ȘI
PIELĂRIE-SUCURSALA INSTITUTUL DE
CERCETARE PIELĂRIE-ÎNCĂLȚĂMINTE,
STR. ION MINULESCU NR.93, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• GAIDAU CARMEN-CORNELIA,
STR. AL. PAPIU ILARIAN NR. 6, BL. 42,
SC. 2, AP. 53, ET. 6, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;

• RÂPĂ MARIA, ALEEA GORNEȘTI, NR.3,
BL.52, SC.1, PARTER, AP.2, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;
• PREDESCU CRISTIAN, STR. DR. PETRE
GĂDESCU NR. 24A, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• STANCA MARIA, STR. SERG. MAJ. CARA
ANGHEL, NR.9, BL.C56, SC.2, ET.7, AP.99,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• ALEXE COSMIN- ANDREI,
STR.DEZROBIRII NR.18-38, BL.33, SC.4,
AP.148, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) NANOFIRE DIN COLAGEN DIN SOLZI DE PEȘTE
ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la nanofire pe bază de colagen extras din solzi de pește și la un procedeu de obținere a colagenului, nanofirele fiind utilizate pentru realizarea pansamentelor non active pentru tratarea rănilor și la alte aplicații medicale. Nanofirele conform invenției sunt obținute prin folosirea unei cantități de colagen cuprinse între 1...50 g care se solubilizează în soluție de acid acetic (3...20: 0,1...10) prin agitare mecanică timp de 30 minute, se introduce soluția în seringă de dozare a aparatului de electrofilare și se reglează debitul la 1...2 mL/oră, cu voltajul cuprins între 22,19...23,24 kV, la o distanță de 13 cm, la o temperatură cuprinsă între 26...26,5°C și 10% UR, pentru a se depune o matrice de nanofire de colagen cu dimensiuni de 176,9 nm, respectiv 110 nm. Procedeul de obținere a colagenului conform invenției începe cu mărunțirea solzilor de pește, spălarea acestora de două ori cu NaCl 5%

N - butanol apoi cu NaOH 5%, timp de 30 min. Pentru îndepărtarea proteinelor, lipidelor, carbohidraților și sărurilor solubile care generează mirosul specific, se degresează prin agitare cu soluție de 10% n - butanol timp de 30 minute, de trei ori succesiv, cu spălări intermediare cu apă distilată până la un pH neutru, urmat de una din variantele de tratare cu EDTA 15% w/v, timp de 16 ore, clătire cu apă distilată și se neutralizează cu acid acetic 0,2% v/v pentru înlăturarea sărurilor, și în altă variantă, fără acest tratament, și încălzire în apă distilată timp de 12 ore, la 60°C, când se obține o dispersie de colagen sub formă de gelatină, care poate fi uscată sub formă de film subțire.

Revendicări: 2
Figuri: 3



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2022 de 782
Data depozit	29-11-2022

NANOFIRE DIN COLAGEN DIN SOLZI DE PESTE SI PROCEDEU DE OBTINERE

Inventia prezintă un nanomaterial nou pe baza de colagen extras din solzi de peste si procedeul de obtinere al acestuia si se adreseaza industriei de biomateriale cu aplicatii in medicina.

Se cunoaste faptul ca solzii de peste reprezinta un deșeu de la industria pestelui, cu o pondere de 2-4% din masa acestuia si care, in prezent, in cea mai mare parte, este aruncat poluand mediul. Se estimeaza ca acest deșeu, organic, urat mirositor, are o pondere de 1-3 milioane t/an, cu o crestere anuala de 2-3% [1]. Exista o pondere mica, estimata la 10% din resursa de solzi de peste care se utilizeaza la fabricarea alimentelor pentru animale.

Solzii de peste reprezinta o componenta exterioara a corpului pestelui cu rol in apararea acestora, structura lor fiind complexa, atat morfologic cat si compozitional, variind in functie de mediul de viata si specia animalului. Rezistenta acestui invelis de solzi poate ajunge la valori importante; determinarea modulul Young indicand valori de la 50 MPa la 2,2 GPa, in functie de specia pestelui [2]. Rezistenta mare a solzilor de peste se datoreaza morfologiei acestora si compozitiei. Astfel, solzii de crap au o structura formata din 8 straturi, in mod similar placajului, in care fibrele de colagen sunt orientate diferit, cu alternante de fibre cu continut redus sau bogat in colagen.

Compozitia medie a solzilor este: 9,7-20,5% umiditate; 50,3-71,3% proteine; 0,3-1,6% lipide; 19,0-38,1% cenusa; 0,35-2,18% carbohidrati; 3,2-7,8% calciu; 0,15-0,20 % magneziu; 0,02-1,3% fier si 0,4-1,1% fosfor.

Foarte multe brevete sunt dedicate extractiei colagenului din solzii de peste si utilizarii acestuia ca aditiv cosmetic, datorita proprietatilor de hidratare si nutritie [3], in bauturi, ca aditiv nutritiv [4], sau ca aliment anti-tumoral [5]. Proprietatile antimicrobiene si bioactive ale colagenului din solzi de peste, de refacere celulara a tesutului pielii, oaselor, corneii, vaselor de sange, au fost intens studiate si apreciate ca fiind promitatoare pentru realizarea de biomateriale eficiente pentru sanatate [6].

Colagenul din solzii de peste este o resursa care s-a dovedit ca



stimuleaza de 2,5 ori mai mult celulele endoteliale ale venei ombilicale umane responsabile pentru formarea colagenului implicat in regenerarea vaselor de sange, comparativ cu colagenul bovin [7].

Exista o literatura de brevete de inventie extrem de bogata privind metodele de extractie si conditionare a colagenului din solzii de peste pentru diverse aplicatii, dar nu au fost identificate brevete privind realizarea de nanofire din colagen extras din solzi de peste. Colagenul extras din solzi de peste s-a dovedit insa ca poate fi utilizat in compozite polimerice de sinteza care au fost apoi electrofilate pentru realizarea de nanofire [8].

Inventia prezenta se refera la realizarea de extracte de colagen din solzi de peste cu proprietati de filare si obtinerea de nanofire cu potentiale aplicatii in realizarea de pansamente pentru vindecarea ranilor.

In cadrul inventiei s-au stabilit metodele de extractie pentru colagenul din solzi de peste, in doua variante, s-au stabilit conditiile de electrofilare si s-au realizat structuri nanoporoase pe baza de nanofire.

Comparativ cu realizarile prezentate in literatura, inventia are urmatoarele avantaje:

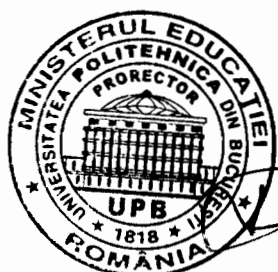
1. Colagenul extras din solzi de peste prezinta proprietati de electrofilare in mediu apos, fara adaos de polimeri sau solventi organici care au potential toxic;
2. Varianta de colagen de peste care nu utilizeaza EDTA, este potential mai activa biologic si mai lipsita de toxicitate, cunoscut fiind ca EDTA este citotoxica si moderat genotoxica;
3. Procedeu de extractie a colagenului este simplu, cu consum mic de energie si timp si permite realizarea de nanofire cu suprafata de contact mare, superioara filmelor sau pudrelor si deci, cu potential bioactiv superior;
4. Nanofirele obtinute sunt biodegradabile, bioabsorbabile, cu proprietati de refacere celulara;
5. Colagenul extras din solzi de peste este un material ieftin, care valorifica un deșeu si este un material cu valoare adaugata mare;



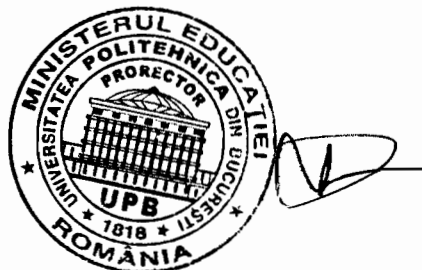
6. Colagenul si nanofirele din colagen din solzi de peste sunt materiale care pot fi utilizate de persoane cu restrictii religioase si nu prezinta pericolul unor boli specifice colagenului de mamifere (encefalopatia spongiforma bovina, etc).

In continuare se prezinta 2 exemple de preparare a colagenului din solzi de peste cu proprietati de filabilitate si obtinerea nanofirelor de colagen extras din solzi de peste.

Exemplul 1. 100 g solzi de crap au fost maruntiti in fragmente de 3 x 3 mm, s-au spalat succesiv cu solutie de NaCl 5% g/v, de 2 ori, si cu solutie de NaOH 5% g/v, timp de 30 minute pentru indepartarea proteinelor, lipidelor, carbohidratilor si sarurilor solubile, care genereaza mirosul specific, urmat de spalare succesiva cu apa distilata. Degresarea s-a realizat prin agitare cu solutie de n-butanol 10% v/v, timp de 30 minute, succesiv, de trei ori, cu sparari intermediare cu apa distilata, pana la pH neutru, care s-a reglat cu acid acetic. Extractia colagenului s-a facut in apa distilata, la 60⁰C, timp de 12 ore, cand s-a obtinut o dispersie de colagen sub forma de gelatina (Fig.1 stanga). In varianta 2, inainte de extractie, solzii de peste se trateaza cu solutie EDTA 15% w/v, timp de 16 ore, se clatesc cu apa distilata si se neutralizeaza cu solutie de acid acetic 0,2% v/v, pentru indepartarea sarurilor de calciu, fier si magneziu (Figura 2 dreapta). Dispersiile de colagen sub forma de gelatina au fost analizate, pentru determinarea tarii gelatinei (Tabel 1) cand s-a constatat ca taria gelatinei este mai mare, in corelatie cu vascozitatea si substanta uscata, pentru varianta 2, cu EDTA. Caracteristicile fizico-chimice prezentate in Tabelul 2 confirma prezenta unor cantitati mici de saruri in varianta fara EDTA si un grad de hidroliza identic pentru ambele variante. Colagenul obtinut sub forma de gelatina se poate usca sub forma de film (Figura 3), care poate fi conservat pe termen nedeterminat si care este electrofilabil.



Exemplul 2. 1-50 g colagen realizat conform Exemplului 1, in variantele solide, au fost dizolvate in solutie de acid acetic (3-20:0,1-10), prin agitare mecanica, timp de 30 de minute, apoi s-a introdus solutia obtinuta in seringa de dozare a aparatului de electrofilare si s-au reglat parametrii de filare la un debit de 1-2 mL/ora, cu voltajul de 22,19-23,24 kV, si distanta de filare de 13 cm, in conditiile ambiante de temperatura de 26,0-26,5 °C si UR de 10%, cand s-au obtinut depune matrici de nanofire de colagen cu dimensiuni de 176,9 nm, respectiv 110 nm, cu potential de a fi utilizate pentru realizarea de pansamente non active (fara antibiotice), pentru tratarea ranilor si alte aplicatii medicale. In Tabelul 3 sunt redade imaginile nanofirelor obtinute din colagen extras din solzi de peste, dimensiunile medii si compozitia determinata prin EDS (energy dispersive X-ray spectroscopy), care confirma compozitia mai mare in Ca (1,03 % atomice fata de varianta cu EDTA cu continut de 0,15% atomice) si fosfor (1,15% atomice fata de 0,33% atomice, in cazul variantei cu EDTA).



ANEXA

BIBLIOGRAFIE

1. N. Harikrishna 1 • S. Mahalakshmi 2 • K. Kiran Kumar³ • Gopal Reddy
Fish Scales as Potential Substrate for Production of Alkaline Protease and
Amino Acid Rich Aqua Hydrolyzate by *Bacillus*, *Indian J Microbiol* (July–
Sept 2017) 57(3):339–343.
2. Yaseen AA, Waqar T, Khan MAA, Asad M and Djavanroodi F, Fish Scales
and Their Biomimetic Applications. *Front. Mater.* 8:649456, 2021.
3. CN101999992A, Fish scale collagen cosmetic, QIANG MIAO, 2011.
4. CN108464415A, Beverage containing fish scale collagen, HUI
CHENGYUE; ZHOU SHUHUI, 2018.
5. CN104223115B, Novel application of fish scale collagen protein, SHI
ZONGJIE; WEI SHAN; ZHANG RONGCUN, 2014
1. Meison Furtado, Liang Chen, Zehao Chen, Ao Chen, Wenguo Cui, *Engi-
neered Regeneration* 3 (2022) 217–231
2. Jun Kit Wang, Kim Pin Yeo, Yong Yao Chun, Timothy Thatt Yang Tan,
Nguan Soon Tan, Véronique Angeli, Cleo Choong, Fish scale-derived
collagen patch promotes growth of blood and lymphatic vessels in vivo,
Acta Biomaterialia, 2017.
3. Jun Kit Wang, Kim Pin Yeo, Yong Yao Chun, Timothy Thatt Yang Tan,
Nguan Soon Tan, Véronique Angeli, Cleo Choong. Fish scale-derived col-
lagen patch promotes growth of blood and lymphatic vessels in vivo. *Acta
Biomaterialia*, 2017; 63: 246.
4. Dung-Yi Wu, Shan-Shue Wang, Chin-San Wu, Antibacterial properties
and cytocompatibility of biobased nanofibers of fish scale gelatine, modi-
fied polylactide, and freshwater clam shell, *International Journal of Biolog-
ical Macromolecules*, 1219–1228, 2018.

7
↓

REVENDICARI

1. Procedeu de obtinere a colagenului din solzi de peste cu proprietati de electrofilare, **caracterizat prin aceea ca pentru extractie, solzii de peste se maruntesc, se spala de 2 ori cu NaCl 5% g/v, apoi cu NaOH 5% g/v, timp de 30 minute pentru indepartarea proteinelor, lipidelor, carbohidratilor si sarurilor solubile, care genereaza mirosul specific, se degreseaza prin agitare cu o solutie de 10% n-butanol, timp de 30 minute, succesiv, de trei ori, cu spalari intermediare cu apa distilata, pana la pH neutru, urmat in una din variante de tratare cu EDTA 15% w/v, timp de 16 ore, clatire cu apa distilata si se neutralizeaza cu acid acetic 0,2% v/v, pentru inlaturarea sarurilor, si in alta varianta, fara acest tratament, si incalzire in apa distilata, timp de 12 ore, la 60°C, cand se obtine o dispersie de colagen sub forma de gelatina, care poate fi uscata sub forma de film subtire.**
2. Nanofire de colagen din solzi de peste, **caracterizate prin aceea, ca pentru obtinerea lor se folosesc 1-50 g colagen obtinut conform procedului descris in Revendicarea 1, care se solubilizeaza in solutie de acid acetic (3-20 : 0,1-10) prin agitare mecanica timp de 30 de minute, se introduce solutia in seringă de dozare a aparatului de electrofilare si se regleaza debitul la 1-2 mL/ora, voltajul la 22,19-23,24 kV, distanta la 13 cm, la 26,0-26,5 °C si 10% UR, cand se depune o matrice de nanofire de colagen cu dimensiuni de 176,9 nm, respectiv 110 nm, cu potential de a fi utilizate pentru realizarea de pansamente non active pentru tratarea ranilor si alte aplicatii medicale.**





Figura 1. Extracte de collagen din solzi de peste:
stanga-fara EDTA (A), dreapta-cu EDTA (B)

Tabel 1 Caracteristici de textura si vascozitatea collagenului extras din solzi de peste

Caracteristici	Colagen extras din solzi de peste, varianta fara EDTA	Colagen extras din solzi de peste, varianta cu EDTA
SU, %	3,6	4,8
Tarie. g	249,4	362,1
Relaxare, %	34,5	14,3
Vascozitatea , CP	40,75	72



Tabel 2- Caracteristici fizico-chimice pentru colagenul extras din solzi de peste

Denumirea incercarii	Caracteristici tehnice	UM	Cod proba/ Valori determinate		Incertitudine	Standard de metoda
			A	B		
Determinarea continutului de substanta uscata	Substanta uscata	%	3,61	4,82	$\pm 0,35$	SR EN ISO 4684 : 2006
Determinarea continutului de cenusa	Cenusa totala	%	0,02	nedetectabil	$\pm 0,24$	SR EN ISO 4047 : 2002
Determinarea continutului de azot	Azot total	%	0,97	0,93	$\pm 0,34$	SR ISO 5397 : 1996
Determinarea continutului de azot aminic	Continut de azot aminic	%	0,012	0,012		**
Determinarea pH-ului din solutii apoase	Valoare pH sol 10%	Unit. de pH	6,59	4,91	$\pm 0,10$	**STAS 8619/3:1990

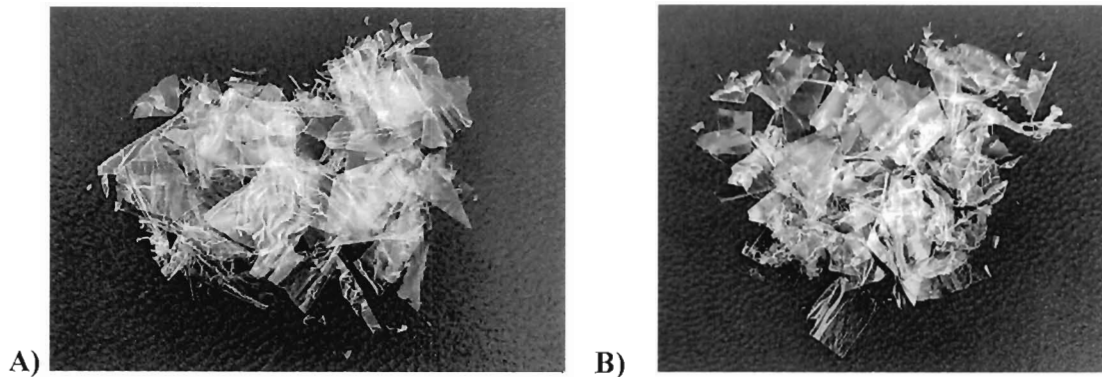


Fig. 2 Colagen de peste: A cu saruri de calciu; B) fara saruri de calciu



[Handwritten signature]



Tabel 3. Nanofire de colagen extras din solzi de peste

