

Raport științific
privind implementarea proiectului
**“Valorificarea Materialului Chitinos din Deseuri Reciclabile prin Utilizarea acestuia
în câteva Aplicații Biologice Potențiale (ReWaChi)”**

Contract de finanțare 70/2021, Cod proiect PN-III-P4-ID-PCE-2020-2243

Perioada: 3 ianuarie 2023 – 29 decembrie 2023

**Stabilirea unei formule optime bazate de chitosan pentru inhibarea
dezvoltării celulelor (culturi de linie umană celulară) și microorganisme pentru
aplicații extinse**

Rezumat

Studiul efectuat în acest an a condus la următoarele concluzii:

- Studiul a inclus testare *in vitro* a impactului unor soluții de chitosan obținut prin controlul parametrilor de extracție și purificare, astfel încât, au fost analizate și evaluate biologic 15 variante experimentale. Pe baza primelor rezultate obținute la testarea *in vitro* (culturi celule umane) și la testarea *in vivo* (doua organisme biotester, folosite în aplicații de toxicitate, ecotoxicitate, acvacultură) au fost create noi protocoale de evaluare folosind amestecuri de chitosan precum și diferite formule de chitosan (CH):chitină (CHT):oligomeri. De asemenea, au fost incluse în testare formulări prin grefare pe chitosan a ionilor de Ceriu (Ce).

- Testele de evaluare a impactului indus de aceste formulări pe bază de chitosan au constat în analiza asupra capacității de supraviețuire și proliferare celulară a unor linii celulare normale și tumorale folosind testul de formare a coloniilor (Clonogenic assay), precum și determinarea nivelurilor de expresie ale proteinei YKL40 asemănătoare chitinazei, în vederea stabilirii eficacității terapeutice a acestor nanocompuși. Au fost analizate celule epiteliale din glanda mamară, MCF-12A (ATCC CRL-3598) și celule epiteliale tumorale provenite dintr-un adenocarcinom de cervix uterin, HeLa (ATCC CRM-CCL-2). Pentru evaluarea exprimării proteinei YKL-40 asemănătoare chitinazei (chitinase-like) a fost folosită linia celulară de melanom SK-MEL-28 (ATCC HTB-72).

- Studiile de identificare a modului în care activitatea biologică a microorganismelor este influențată de prezența chitosanului cu masă molară diferită și în corelație cu variația concentrațiilor probelor testate au pornit de la informația că mecanismele manifestate diferit asupra sistemelor biologice (bacterii, fungi) sunt în funcție de structura sistemelor biologice expuse și ținta polimerului care poate fi la nivel celular sau molecular (interacțiunea dintre chitosan și componentele membranare, modul de pătrundere în structurile celulare). Au fost analizate efectele induse de prezența moleculelor de chitosan cu mase molare și grade de deacetilare diferite asupra a trei tulpini de bacterii cu proprietăți structurale diferite precum și cu acțiune patogenă și virulență variată, tulpini de interes în domeniul sănătății publice. Astfel, au fost analizate efectele asupra unei specii gram - pozitive *Staphylococcus aureus* (ATCC 23235) iar din categoria gram - negative au fost evaluate *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27353) și *Escherichia coli* (ATCC 25922). Pentru testarea acțiunii antifungice au fost folosite două specii ale genului *Candida*: *Candida albicans* ATCC 10231 și *Candida parapsilosis* ATCC 22019. În urma experimentelor efectuate s-au constatat următoarele aspecte: chitosanul induce inhibiția bacteriei *S. aureus*, în funcție de masa molară astfel, la probele cu MM cuprinsă între 170 și 413 kDa, efectele antibacteriene încep de la concentrația de 50 μg/mL. Chitosanul cu MM între 475 și 992 kDa induce inhibiția bacteriană la concentrații mai mari de 200 μg/mL. Aceste observații pot fi asociate unor explicații din literatură, conform cărora particulele mai mici pot pătrunde mai rapid în celule. Nu au fost identificate fenomene de inhibiție bacteriană la moleculele de chitosan cu masa molară mică de 26,30 kDa (C4) și 155 kDa (C16). Probele de chitosan testate, au avut efecte apropiate de concentrațiile bactericide ale antibioticelor analizate comparativ, ceea ce oferă perspective promițătoare privind aplicațiile viitoare.

- Un alt aspect analizat a fost aderența acestor microorganisme asupra filmelor pe bază de chitosan. Astfel, membrane obținute din chitosan de concentrații 0,5%, 1%, 2%, în solvenți diferiți

(acid acetic și acid lactic), în condiții de variație a temperaturii, au fost expuse culturilor bacteriene. A fost evaluat modul în care aceste microorganisme păstrează sau nu aderența pe suprafețele membranelor, aspect important pentru aplicațiile biomedicale ale chitosanului, dar și în alte aplicații cum ar fi obținerea de ambalaje sau filtre pentru apă. În studiul nostru, membranele obținute la temperaturi scăzute au avut un efect inhibitor total la concentrații variabile de chitosan asupra tuturor bacteriilor. Ca urmare, efectul temperaturii în procesul de configurare a membranelor este la fel de important ca și concentrația polimerului.