

# “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: 4 ianuarie 2020 – 29 decembrie 2023

## Rezumat

Cercetările întreprinse în timpul implementării acestui proiect au condus la următoarele concluzii:

- Deșeurile valorificabile pentru obținerea chitinei sau chitosanului provenite din surse cum ar fi reziduurile alimentare reciclate din consumul de crustacee, conform datelor analizate din chestionarul preferințelor alimentare, pot ajunge la aproximativ 200 g/lună/persoană.
- Prepararea atât în mediul privat cât și în restaurante poate oferi oportunitatea colectării și valorificării, pe termen scurt, a unei cantități reciclabile consistente, în zona litorală, mai ales în sezonul estival, la 1000 consumatori se aproximează o biomasă posibilă de 54,5 kg/lună din care 10,9 kg este deșeurilor valorificabil.
- Cel mai important mijloc de evaluare și colectare a deșeurilor din mediu este asociat cu urmărirea efectelor de eliberare, în condițiile modificării factorilor fizico-chimici sezonieri previzibili și imprevizibili cu potențial major respectiv, furtuna.
- Diferențele de frecvență a deșeurilor sunt corelate cu factorii naturali (sediment, substrat, abundența speciilor, ecologia sau biologia acestora). Observațiile permit anticiparea obținerii biomasei variate și a unei compoziții specifice pentru fiecare stație și sezon de recoltare.
- Cele mai abundente sunt bio-deșeurile provenite din mediul natural, din sectorul Năvodari, lângă digul artificial, unde se concentrează o gamă largă de factori, favorizând și nivelul posibilităților de extragere ocazională sau după furtună.
- *R. venosa* oferă o masă considerabilă de deșeuri organice, constând în capsule goale de ouă, distingându-se o aglomerare în porțiunile superioare ale supralitoralului, respectiv plaja accesibilă recoltării rapide.
- În procesul de obținere a chitinei/chitosanului din aceste tipuri de deseuri tratamentul de deproteizare influențează gradul de deacetilare, acesta fiind maxim când concentrația de NaOH este 5% și temperatura de procesare este mică, condițiile din tratamentul cu soluția de HCl neafectând semnificativ gradul de deacetilare.
- Când este importantă atât masa molară a chitosanului cât și gradul de deacetilare, atunci condițiile din tratamentul acid devin importante. Concentrația de HCl poate varia în limitele studiate, dar tratamentul acid trebuie să fie realizat într-o singură etapă atunci când se urmărește un chitosan cu grad de deacetilare mare și masa molară mare, în timp ce pentru un chitosan cu grad de deacetilare mare, dar masă molară mică tratamentul acid trebuie realizat cu soluție mai concentrată de HCl și cel puțin două repetări. Pentru acest din urmă caz contribuția factorilor „concentrație HCl” și „ număr tratamente acide” este semnificativă.
- Randamente bune în obținerea de chitosan, prin extracție chimică din capsule de ouă de *R. venosa* se obțin la temperatura de 90 °C, iar concentrația soluțiilor de deproteizare, indiferent de valoare are aceeași influență. Astfel, se poate considera ca optimizat procesul de extracție, din punct de vedere al randamentului, prin utilizarea unei concentrații minime de NaOH, la temperatura de procesare, de 90 °C.
- Evoluția gradului de deacetilare cu variația celor doi factori (concentrația de NaOH și raportul NaOH : chitină (v:m)) arată o variație continuu crescătoare a DD cu creșterea ambilor factori. În domeniul investigat, valoarea maximă a DD este în punctul  $x_1 = 1$ ,  $x_2 = 1$  care corespunde unei concentrații de 55 % NaOH și unui raport v:m de 15:1. Cum experimentul desfășurat în

acest punct a condus la o valoare medie de 99 %, practic acesta este considerat punctul de optim.

- Se remarcă faptul că din punctul de vedere al concentrației de NaOH și al duratei, condițiile de obținere a valorilor maxime atât pentru gradul de deacetilare, cât și pentru masa molară sunt foarte apropiate. Raportul lichid solid, care de altfel influențează puțin aceste două caracteristici ale chitosanului, pare să fie favorabil la valori mai mici (15/1) creșterii gradului de deacetilare, în timp ce masa molară maximă poate fi obținută la un raport 18/1. În funcție de importanța relativă a celor două criterii (grad de deacetilare și masă molară) se pot selecta din frontul Pareto puncte de optim corespunzătoare, pentru care se pot identifica condițiile de operare.
- Proprietățile nanoparticulelor de chitosan, cum ar fi dimensiunea, polidispersitatea și potențialul zeta depind atât de masa moleculară și de gradul de deacetilare al chitosanului, cât și de surfactantul folosit.
- Activitatea antioxidantă a probelor de chitosan s-a realizat prin monitorizarea capacității de captare a două tipuri de radicali: ROS (radicali de viață scurtă) prin metoda chemiluminescenței și radicali cationici de viață lungă ABTS<sup>•+</sup> prin metoda TEAC. Probele de chitosan au prezentat o activitate de captare a radicalilor ROS cuprinsă între 55,1-98,4 % și o capacitate de inhibiție a radicalilor ABTS<sup>•+</sup> cuprinsă între 14,33 și 90,9 %, această capacitate fiind influențată de gradul DDA și masa moleculară a chitosanului.
- Chitosanul manifestă efecte similare în sistemele *in vivo*, la nivel fiziologic, în special prin blocarea activității membranare. Efectele sunt influențate de proprietățile particulelor din soluții precum și de raportul chitină: chitosan: oligochitosan, care influențează pasajul prin membrane.
- Toxicitatea sau citotoxicitatea în majoritatea soluțiilor testate este redusă sau moderată la larve de *Artemia*. Prezența oligochitosanului favorizează supraviețuirea larvelor, pătrunderea oligochitosanului fiind favorizată prin ingestie. Testarea pe organisme mai complexe *G. balcanicus*, denotă un alt aspect și anume, viteza de pătrundere a polimerului la nivel branhial depinde de raportul chitină: chitosan și generează modificarea homeostaziei ionice și scăderea viabilității, în timp scurt.
- Chitosanul trece prin tubul digestiv ajungând să fie evidențiat microscopic în celule epiteliale, cuticulă, celule ale tubului digestiv, precum și în alte tipuri de celule cum sunt miocitele, după 48 de ore de la expunerea organismelor la concentrații de minim 35 μg/mL Cs, metoda de marcarea cu FITC fiind eficientă pentru identificarea chitosanului în celule.
- Testele de evaluare a impactului indus de aceste formulări pe bază de chitosan au constatat 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 tumorale – celule epiteliale 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).
- Evaluarea cu MTT a impactului moleculelor de chitosan luate în studiu asupra viabilității celulare a relevat inducerea unui efect citotoxic, diferențiat ca amplitudine în funcție de compus, de doza tratamentului *in vitro* – fiind demonstrată existența relației doză-efect – și de tipul de cultură celulară. Este de remarcat faptul că, la culturile de celule tumorale HeLa gradul de afectare a viabilității celulare este mai pronunțat decât cel al celulelor sănătoase MCF-12A. Corelat cu rezultatele obținute prin testul MTT, afectarea morfologiei și, implicit, a viabilității celulare, a fost mai intensă în cazul celulelor tumorale HeLa, după tratamentul de 48 de ore.
- Ansamblul rezultatelor referitor la evaluarea nivelurilor de expresie ale proteinelor asemănătoare chitinazei, în special a YKL 40 în liniile celulare normale și tumorale converg către concluzia că formulele pe bază de chitosan au indus o reactivitate celulară dependentă de doză, demonstrându-se existența relației doză-efect. De asemenea, răspunsul citofiziologic a fost influențat atât de durata tratamentului, cât și de tipul de cultură celulară, fiind mai intens după 48 ore de tratament și pe linia celulară tumorală. Exprimarea nivelurilor de YKL-40 (pg/ml) în

celulele de melanom uman, SK-MEL-28 după tratamentul cu diverse formule de chitosan:oligochitosan s-a manifestat prin creșteri semnalate în cazul variantelor Cs11 și Cs14, valori ușor mai crescute comparativ cu martorul stimulat. Ca urmare, o creștere a expresiei ar putea fi stimulată la concentrații mici de chitosan de masă molară cuprinsă între 400-800 kDa.

- 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).
- 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 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 virulentă 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. Chitosanul induce inhibiția bacteriei *S. aureus*, în funcție de masa molară astfel, probele cu MM cuprinsă între 170 și 413 kDa, efectele încep de la concentrația de 50 μg/mL. Chitosanul cu MM între 475 și 992 kDa induce efecte 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 testate de chitosan, au avut efecte apropiate de concentrațiile bactericide ale antibioticelor testate, 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. Efectul temperaturii în procesul de configurare a membranelor este la fel de important ca și concentrația polimerului.