

ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI
INSTITUTUL DE CHIMIE

Cu titlu de manuscris
C.Z.U.: 544.165.546.72(043.3)

ANGHEL LILIA

**ASPECTE FIZICO-CHIMICE ALE PROCESULUI DE SINTEZĂ
MICROBIOLOGICĂ A NANOPARTICULELOR DE FIER**

144.01 – CHIMIE FIZICĂ

Autoreferatul tezei de doctor în științe chimice

CHIȘINĂU, 2016

Teza de doctorat a fost elaborată în Laboratorul de Chimie Cuantică, Cataliză și Metode Fizice, Institutul de Chimie al Academiei de Științe a Moldovei.

Conducător științific:

DUCA Gheorghe, acad., dr. hab. în șt. chimice, prof. univ., Academia de Științe a Moldovei

Referenți oficiali:

1. **GONȚA Maria**, dr. hab în șt. chimice, prof. univ., Universitatea de Stat din Moldova
2. **ISAC-GUȚUL Tatiana**, dr. în șt. chimice, conf. univ., Universitatea de Stat din Moldova

Membrii Consiliului Științific Specializat:

1. **LUPĂSCU Tudor**, **președinte**, mem. cor., dr. hab. în șt. chimice, prof. cerc., Institutul de Chimie al Academiei de Științe a Moldovei
2. **NASTAS Raisa**, **secretar științific**, dr. în șt. chimice, conf. cerc., Institutul de Chimie al Academiei de Științe a Moldovei
3. **TIGHINEANU Ion**, acad., dr. hab. în șt. fizico-matematice, prof. univ., Academia de Științe a Moldovei
4. **RUDIC Valeriu**, acad., dr. hab. în șt. biologice, prof. univ., Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei
5. **POVAR Igor**, dr. hab. în șt. chimice, prof. univ., Institutul de Chimie al Academiei de Științe a Moldovei
6. **FONARI Marina**, dr. în șt. chimice, conf. cerc., Institutul de Fizică Aplicată al Academiei de Științe a Moldovei

Susținerea va avea loc la ”08” iulie 2016, ora 14⁰⁰, în ședința Consiliului Științific Specializat D 05.144.01-01 din cadrul Institutului de Chimie al Academiei de Științe a Moldovei, MD-2028, str. Academiei 3, Chișinău, Republica Moldova.

Teza de doctor și autoreferatul pot fi consultate la Biblioteca Științifică Centrală ”A. Lupan” a Academiei de Științe a Moldovei și pe pagina web a C.N.A.A. (www.cnaa.md).

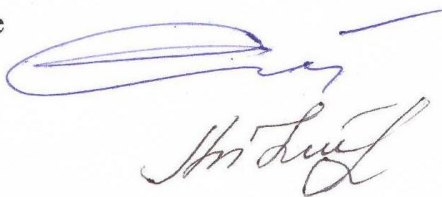
Autoreferatul a fost expediat la ”08” iunie 2016.

Secretar științific al Consiliului Științific
Specializat, dr. în științe chimice



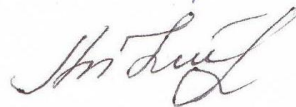
Nastas Raisa

Conducător științific dr. hab. în științe
chimice, prof. univ., acad.



Duca Gheorghe

Autor



Anghel Lilia

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța problemei abordate. Nanotehnologia este un domeniu multidisciplinar care poate revoluționa un număr mare de aplicații în diferite arii ale științei și tehnologiei. Dezvoltarea continuă a acestui domeniu include și crearea noilor metode de sinteză a materialelor la scară nanometrică (sub 100 nm) care să permită controlul riguros al dimensiunii, dispersității, omogenității și compoziției chimice ale acestor nanostructuri, dar și cercetarea acestora pentru definirea potențialelor aplicații [1].

Metoda de sinteză este o componentă importantă în stabilirea domeniului de aplicabilitate a nanoparticulelor, întrucât aceasta influențează direct proprietățile morfologice, structurale (mărimea și forma particulelor), chimice și magnetice ale nanoparticulelor sintetizate [1, 2]. Astfel, există un interes continuu îndreptat spre elaborarea noilor metode de sinteză a particulelor de dimensiuni nanometrice. Nanoparticulele pe bază de fier ca și nanoparticulele în general se pot prepara prin metode fizice, chimice sau biologice [3]. Cele mai utilizate tehnici fizice sau chimice utilizate pentru sinteza nanoparticulelor pe bază de fier includ condensarea [4], nano-dispersarea [5], descompunerea termică [6], reducerea chimică [7], sinteza în miclele inverse [8] și co-precipitarea [9]. Tehnicile biologice de sinteză a materialelor constau în utilizarea enzimelor microbiene, agenților fitochimici cu proprietăți oxidante sau reducătoare, sau utilizarea directă a microorganismelor pentru sinteza nanoparticulelor [10-13]. Metodele biologice reprezintă o categorie aparte, întrucât acestea oferă posibilitatea de a obține nanoparticule ale căror proprietăți fizico-chimie sunt compatibile cu proprietățile biochimice ale mediului celular [14]. Din acest motiv, nanoparticulele obținute prin metodele biologice prezintă interes pentru aplicațiile bio-medicale. În cadrul categoriei de tehnici biologice de sinteză se detașează metoda microbiologică, care constă în utilizarea biomasei celulare pentru obținerea particulelor metalice de dimensiuni nanometrice. În ultimii ani asistăm la o intensificare a cercetărilor la nivel internațional privind sinteza microbiologică a nanoparticulelor metalice.

Literatura de specialitate abundă de dovezi experimentale ce demonstrează capabilitatea mai multor organisme, atât unicelulare cât și pluricelulare, de a sintetiza materiale anorganice, fie intracelular sau extracelular [15-19]. La nivel național au fost inițiate cercetările legate de obținerea nanoparticulelor de argint cu utilizarea tulpinii de microalge verzi-albastrii *Spirulina platensis* [20, 21]. În acest context, apare necesitatea de a studia mecanismele care stau la baza sintezei microbiologice a nanoparticulelor pe bază de fier și evaluarea rolului macromoleculelor organice de tip proteine participante în cadrul acestor mecanisme. Studiarea structurii proteinelor și a proceselor biochimice ale acestora conduce la o înțelegere mai bună a procesului de sinteză

microbiologică a particulelor de dimensiuni nanometrice, ceea ce va permite îmbunătățirea parametrilor de structură a nanoparticulelor pentru diferite aplicații.

Scopul tezei constă în studierea aspectelor fizico-chimice și mecanismului sintezei microbiologice a nanoparticulelor pe bază de fier.

Obiectivele generale urmărite în cadrul cercetărilor descrise în teză sunt următoarele:

- elaborarea unei metodologii de testare a microorganismelor pentru identificarea capacității de sinteză a nanoparticulelor de fier pe baza tulpinii *Dunaliella salina* CNM-AV-02, la nivel de laborator;
- identificarea factorilor fizico-chimici ce favorizează procesul de sinteză microbiologică a nanoparticulelor pe bază de fier la *Dunaliella salina* CNM-AV-02;
- determinarea grupărilor funcționale din biomasa celulară a *Dunaliellei salina* CNM-AV-02 implicate în procesul de legare a ionilor de Fe(III);
- cercetarea proteinelor implicate în procesul de sinteză microbiologică a nanoparticulelor pe bază de fier la *Dunaliella salina* CNM-AV-02 prin metode experimentale și simulări de dinamică moleculară pentru stabilirea mecanismelor care stau la baza procedurii de sinteză dirijată a nanoparticulelor de fier.

Noutatea și originalitatea științifică. Pentru prima dată a fost elaborată metodologia de evaluare a capacității microorganismelor de a sintetiza nanoparticule pe bază de fier, utilizând ca model de studiu tulpina *Dunaliella salina* CNM-AV-02.

Au fost cercetați factorii esențiali și identificate condițiile optime pentru realizarea procesului de acumulare a ionilor de fier și formare a unor structuri de dimensiuni nanometrice, în celulele vii ale microorganismelor. Pentru prima dată au fost identificate grupările funcționale din biomasa celulară a tulpinii de microalge verzi *Dunaliella salina* CNM-AV-02 implicate în procesele fizico-chimice de acumulare a ionilor de fier.

Pentru prima dată a fost utilizată metoda de simulare de dinamică moleculară pentru cercetarea mecanismelor procesului de sinteză a nanoparticulelor pe bază de fier.

De asemenea, pentru prima dată au fost stabilite mecanisme ion-moleculare ale procesului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor pe bază de fier prin metode fizico-chimice și simulări de dinamică moleculară.

Problema științifică soluționată constă în identificarea mecanismelor ion-moleculare care stau la baza procedurii dirijate de sinteză a nanoparticulelor de fier cu utilizarea tulpinii de microalge verzi *Dunaliella salina* CNM-AV-02.

Semnificația teoretică. Cunoștințele fundamentale obținute au fost ulterior utilizate pentru explicarea mecanismelor procesului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor pe bază

de fier cu utilizarea microalgelor. De asemenea, a fost demonstrată posibilitatea utilizării metodelor de simulare de dinamică moleculară pentru explicarea fenomenelor fizico-chimice ce se petrec la nivel molecular.

Valoarea aplicativă a lucrării. Cercetările aplicative derulate în cadrul acestei teze de doctorat oferă posibilitatea evaluării capacității microorganismelor de a sintetiza nanoparticule, dar și optimizarea metodelor microbiologice existente pentru modificarea dirijată a parametrilor fizico-chimici ai nanoparticulelor de interes științific.

Rezultate științifice principale înaintate spre susținere:

- Identificarea condițiilor optime pentru realizarea procesului de acumulare a ionilor de fier și formare a unor structuri de dimensiuni nanometrice în celulele vii ale tulpinii de microalge verzi *Dunaliellei salina*.
- Elaborarea procedurii de evaluare a procesului de sorbție microbiologică, fiind recomandat ca un protocol de cercetare pentru testarea microorganismelor, cu scopul de a identifica capacitatea de producere a nanoparticulelor metalice.
- Determinarea grupărilor funcționale ale proteinelor și polizaharidelor, sintetizate de celulele vii ale *Dunaliellei salina* CNM-AV-02, implicate în procesul de legare a ionilor de Fe(III).
- Identificarea mecanismelor procesului de sinteză microbiologică la nivel unimolecular prin cercetarea interacțiunii moleculei de lactoferină cu ionii de Fe(III) cu aplicarea tehnicilor experimentale și computaționale.
- Stabilirea factorilor ce influențează procesul de legare a ionilor de Fe(III) pe centrul activ al proteinei.
- Utilizarea metodei de simulare de dinamică moleculară pentru demonstrarea importanței ionilor de carbonat în stabilizarea centrilor activi responsabili de legarea ionii de Fe(III).

Implementarea rezultatelor științifice. Metoda de evaluare a microorganismelor pentru identificarea capacității de obținere a nanoparticulelor, la nivel de laborator, a fost testată în Laboratorul de Ficobiotehnologie, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie AȘM.

Posibilități de aplicare în practică: (i) a protocolului de sinteză microbiologică pentru obținerea nanoparticulelor metalice cu o gamă largă de aplicații bio-medicale; (ii) a metodologiei simulărilor de dinamică moleculară adaptată pentru cercetarea interacțiunii moleculelor de tip proteină cu ionii metalici.

Aprobarea rezultatelor. Rezultatele obținute au fost prezentate la 10 conferințe științifice și publicate în 12 lucrări științifice. Rezultatele descrise în teză au fost apreciate cu: Diplomă pentru cea mai bună prezentare poster în Aplicații ale Fizicii Nucleare la conferința ”2nd European Nuclear Physics Conference”, 17-21 Septembrie 2012, România; Diploma

Laboratorului de Fizică a Neutronului ” I. M. Frank” al Institutului Unificat pentru Cercetări Nucleare, Dubna, Federația Rusă, 2013; Premiul Institutului Unificat pentru Cercetări Nucleare, Dubna, Federația Rusă, în domeniul Cercetărilor în Fizică Experimentală, 20 februarie 2015.

De asemenea, rezultatele obținute au fost prezentate în cadrul seminarelor științifice:

1. “Molecular dynamics simulations and experimental studies of diferric human lactoferrin”, Departamentul de Fizică Nucleară, IFIN-HH, Magurele, București, România;
2. ”Molecular Dynamics simulations of human lactoferrin: Insights into the mechanism of iron binding”, Departamentul de Fizică Nucleară, IFIN-HH, Magurele, București, România;
3. ”Molecular Dynamics simulations of the mechanism of iron binding to lactoferrin”, Institutul de Chimie al Academiei de Științe a Moldovei, Chișinău.

Structura și volumul tezei. Teza de doctor este structurată în patru capitole principale în care sunt prezentate noțiuni teoretice și contribuții proprii ce constau din rezultate obținute experimental și teoretic, concluzii generale și recomandări.

Publicații pe tema tezei. Rezultatele obținute sunt publicate în 12 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: nanoparticule de fier, mecanisme moleculare, biosorbție, Dunaliella salina, biomineralizare, lactoferina, simulări de dinamică moleculară.

1. SINTEZA MICROBIOLOGICĂ A NANOPARTICULELOR DE FIER

În prima parte a acestui capitol este prezentată o scurtă introducere despre aplicațiile nanoparticulelor de fier, urmată de descrierea metodelor de sinteză a nanoparticulelor cunoscute și utilizate pe larg la momentul actual. De asemenea, este introdusă o scurtă discuție despre metoda microbiologică de sinteză a nanoparticulelor pe bază de fier cu accent pe aspectele fizico-chimice ale mecanismelor implicate în cadrul acestei metode. Sunt exemplificate mecanismele moleculare identificate și descrise în literatura științifică. Se subliniază importanța studierii mecanismelor implicate în metoda microbiologică de sinteză a nanoparticulelor.

Nanoparticulele pe bază de fier constituie subiecte de cercetare de mare interes datorită utilizării acestora într-o gamă largă de aplicații precum dispozitive de înregistrare, catalizatori, materiale magnetice, dispozitive pentru remedierea mediului și fluide cu aplicații bio-medicale [22]. Proprietățile fizice și chimice ale nanoparticulelor sunt influențate direct de forma și dimensiunea acestora [23]. Prin urmare, proprietățile acestora pot fi controlate aplicând o metodă de sinteză corespunzătoare. S-a arătat că metodele biologice oferă posibilitatea de a obține nanoparticule compatibile cu mediul celular și țesuturile vii, contribuind la lărgirea potențialului de aplicații bio-medicale. O metodă eficientă de producere a nanoparticulelor de fier biocompatibile este metoda microbiologică, care implică utilizarea microorganismelor.

În a doua parte a capitolului 1 sunt aduse exemple de microorganisme capabile de a sintetiza nanoparticule pe bază de fier [24, 25]. Pentru eficientizarea metodelor microbiologice existente este necesară studierea mecanismelor, care stau la baza formării nanoparticulelor. Mecanismele sintezei microbiologice a nanoparticulelor nu au fost concretizate până în momentul de față. Motivul principal este că celulele microorganismelor reacționează în mod diferit față de ionii metalelor prezenți în mediul celular, iar procesele metabolice implicate diferă și ele între speciile microorganismelor [26]. Tot aici, sunt prezentate exemple ale mecanismelor, identificate pentru tulpinile bacteriilor fier-reducătoare precum *Geobacter metallireducens* și *Shewanella putrefaciens* și grupul de bacterii sulfat-reducătoare, precum *Desulfuromonas* și *Actinobacter*, care în prezent sunt utilizate pentru sinteza nanoparticulelor de fier.

Analiza efectuată în cadrul acestui capitol a permis identificarea obiectivelor și direcțiilor principale de cercetare, precum și a căilor de soluționare.

2. ASPECTELE FIZICO-CHIMICE ALE SINTEZEI MICROBIOLOGICE A NANOPARTICULELOR DE FIER

În capitolul 2, este formulat protocolul de cercetare pentru evaluarea capacității microorganismelor de a sintetiza nanoparticule pe bază de fier, în condiții de laborator, cu utilizarea tulpinii *Dunaliella salina*. Studiile prezentate în acest capitol sunt realizate cu ajutorul spectroscopiei UV-VIS și FTIR.

În calitate de material biologic au fost utilizate celulele vii ale *Dunaliellei salina* (Figura 2.1), crescute în Laboratorul de Ficobiotehnologie al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei.

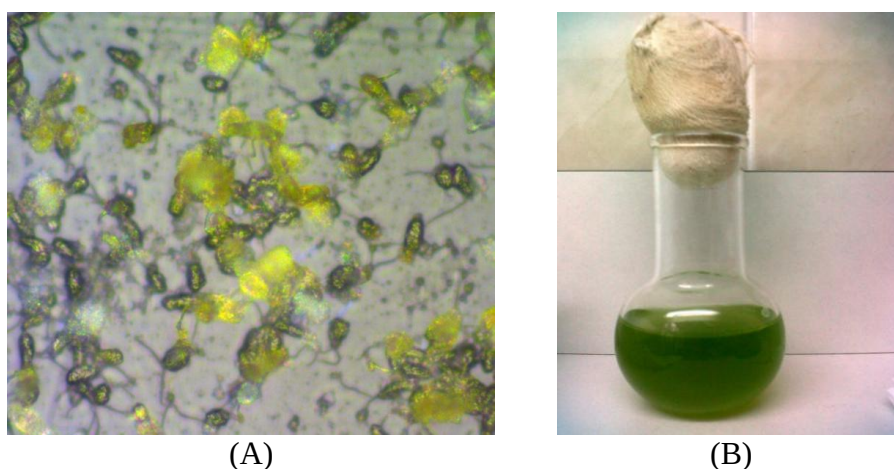


Fig. 2.1. Celulele *Dunaliellei salina* CNM-AV-02: (A) văzute sub microscop; (B) *Dunaliella salina* CNM-AV-02 cultivată în mediu lichid în condiții de laborator.

Tulpina microalgei verzi *Dunaliellei salina* a fost utilizată datorită proprietății de a adsorbi ioni metalici din soluții apoase, precum și datorită capacității de bio-remediere a acestora. În lucrările științifice publicate sunt raportate studii de sorbție a ionilor de cadmiu, arseniu, plumb, mercur și aluminiu de către tulpina *Dunaliellei salina* [27-31]. O observație importantă în acest sens este că *Dunaliella salina* are o afinitate sporită față de metalele grele. În aceleași condiții, celulele *Dunaliellei salina* au o tendință mare de acumulare a ionilor de zinc, urmată de cupru și cobalt, prezentând o tendință mai mică de acumulare a ionilor de cadmiu [32]. Această microalgă verde are o selectivitate sporită a sistemului de transport a ionilor de fier (III), care se realizează cu participarea unei proteine, identificată ca membru al familiei de transferine.

În cadrul acestui capitol sunt cercetați factorii ce influențează performanța sorbției microbiologice cu utilizarea tulpinii *Dunaliella salina* CNM-AV-02. În acest sens, este urmărit procesul de sorbție microbiologică a ionilor de Fe(III) din mediul extracelular în funcție de factorii operaționali: timpul de contact, cantitatea de biomasa utilizată, valoarea pH-ului inițial al soluției, concentrația inițială a ionilor de fier (III) în mediu, prezența ionilor de fier în mediul de cultivare al celulelor; prezența altor specii în mediu; efectul salinității mediului de cultivare.

Procesul de sorbție microbiologică a fost urmărit pentru sistemele în care suspensia de biomasă celulară a fost dispersată în soluție de citrat de fier (III) de concentrație 0,5 mM în 50 mM HEPES (acid N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etan sulfonic)). Cinetica procesului de sorbție a ionilor de fier de către celulele vii ale *Dunaliellei salina* este prezentată în Figura 2.2.

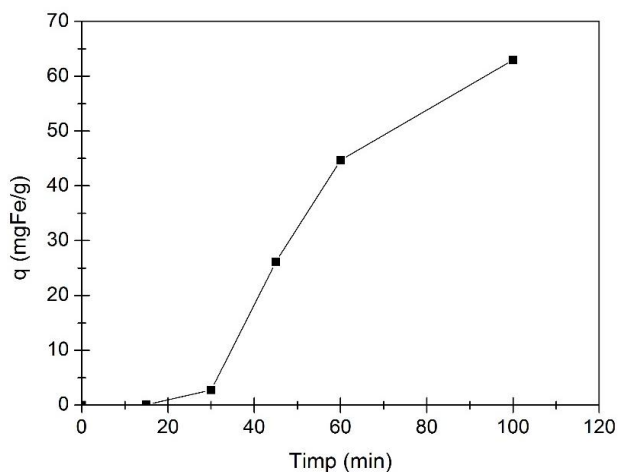


Fig. 2.2. Cinetica procesului de sorbție a ionilor de fier (III) de către celulele vii ale *Dunaliellei salina*. Condiții: citrat de fier (III) – 0,5 mM în 50 mM HEPES; concentrația biomasei - 0,35 g/L; pH 8,0

Reieșind din rezultatele obținute, se observă că în primele 15 minute de contact dintre celulele *Dunaliellei salina* și soluția de citrat de fier (III) sorbția este aproape nulă. Legarea ionilor de Fe(III) din mediul celular începe încet după primele 15 minute de contact și crește

rapid după 45 minute. Întârzierea înregistrată în profilul evoluției în timp a procesului de sorbție microbiologică a fost asociată cu timpul necesar celulelor *Dunaliellei salina* de a sintetiza liganzi, responsabili de legarea ionilor de Fe(III) din mediul extracelular, inclusiv proteine transportoare de cationi metalici.

A fost studiată influența biomasei celulare vie asupra procesului de sorbție microbiologică. S-a observat că, creșterea cantității de biomasă celulară vie în sistemele modelate va conduce la sporirea procesului de acumulare a ionilor de Fe(III).

De asemenea, a fost examinat efectul valorii pH-ului inițial al soluțiilor asupra procesului de sorbție microbiologică a ionilor de Fe(III) de către celulele vie ale *Dunaliellei salina*. Cercetările au arătat că pH-ul optim pentru a asigura o adsorbție maximă este de 8,0, la care proteina de tip transferină sintetizată de celulele *Dunaliellei salina*, prezintă activitate maximă.

Cercetarea influenței concentrației inițiale a ionilor de fier (III) în sistemele modelate, relevă că pentru intervalul de concentrații 0,3-2,5 mM de citrat de fier (III), sorbția se intensifică odată cu creșterea concentrației citrat de fier (III) în sistem. De asemenea, a fost studiat efectul altor factori operaționali ai procesului de biosorbție, precum prezența ionilor de hidrogenocarbonat, salinitatea mediului de cultivare și prezența ionilor de fier în mediul de cultivare. Cercetările au arătat că procesul de sorbție a ionilor de fier (III) de către biomasa *Dunaliellei salina*, cultivată în mediu deficitar de fier, se intensifică în prezența ionilor de hidrogenocarbonat.

Procesul de sorbție microbiologică a ionilor de Fe(III) a fost descris cu ajutorul modelelor izotermelor de adsorbție Langmuir, Freundlich și Dubinin-Radushkevich. Conform rezultatelor de fitare a datelor experimentale cu ecuațiile liniare ale modelelor studiate, modelul Freundlich descrie cel mai bine ($R^2=0,9881$) procesul de sorbție a ionilor de Fe(III) de către microalga *Dunaliella salina* (Figura 2.3).

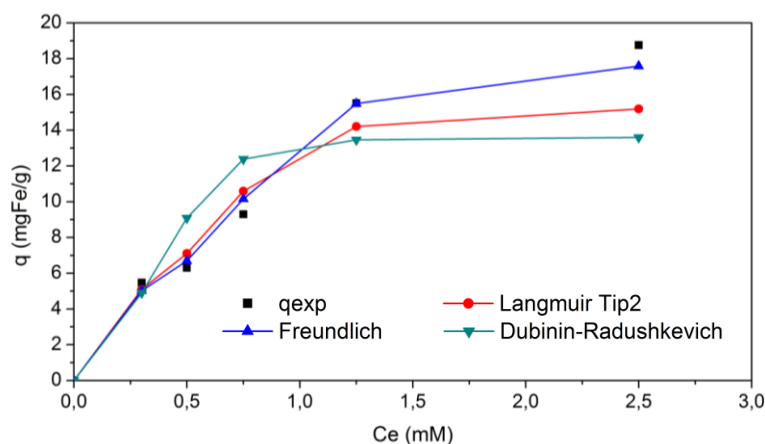


Fig. 2.3. Izotermele de adsorbție a ionilor de fier (III) de tulpina *Dunaliellei salina* construite după modelul regresiei liniare.

Capacitatea maximă de adsorbție calculată pe baza modelului Langmuir este de 39,2781 mgFe/g, pentru $R^2=0,9715$. Factorul de separare R_L are valoarea calculată de 0,7169, ceea ce conduce la concluzia că procesul de sorbție microbiologică este favorabil pe întreg domeniul de concentrații studiat.

Analiza spectrală în domeniul IR a fost aplicată pentru studierea probelor de biomasă uscată fără fier și cu fier (Figura 2.4). Compararea celor două spectre arată că în spectrul înregistrat pentru biomasa îmbogățită cu fier, în domeniul $3300-2850\text{ cm}^{-1}$, apar două peak-uri intense, desemnate pentru gruparea OH legată și vibrația de întindere NH. Adicional, au fost înregistrate modificări ale peak-urilor pentru numerele de undă ale aminelor primare (deplasarea de la 1643 cm^{-1} spectrul (a) spre 1591 cm^{-1} (b)) și secundare ale proteinelor (aparitia peak-ului în spectrul (b) 1545 cm^{-1}). Aceste observații conduc la concluzia ca aceste grupe funcționale sunt implicate în legarea fierului din mediu prin intermediul reacțiilor de complexare ale proteinelor și polizaharidelor sintetizate de tulpina *Dunaliellei salina*.

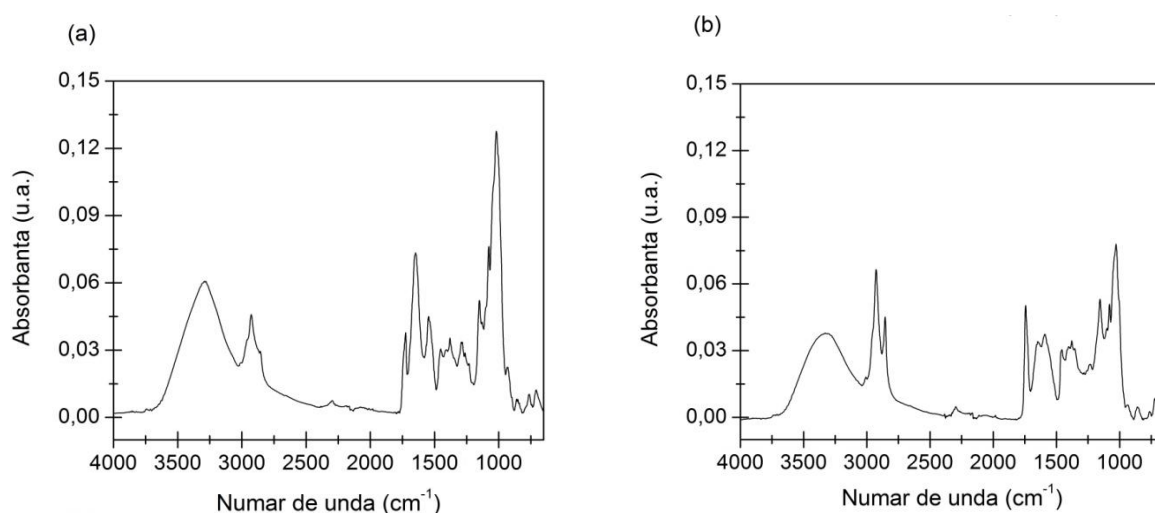


Fig. 2.4. Spectrele FTIR înregistrate pentru biomasa uscată a *Dunaliellei salina*, (a) fără fier și (b) îmbogățită cu fier.

Dunaliella salina este cunoscută pentru producerea abundentă de polizaharide pe care le secretă în mediul extracelular [154]. Aceste polizaharide, în mediul apos, au tendința de a forma agregate extracelulare de dimensiuni mari care se comportă ca și cationiți pentru metalele grele [155]. Peak-urile caracteristice polizaharidelor (C-O și C-O-C), identificate în spectrele FTIR, suferă și ele modificări, deplasându-se spre numere de undă mai mici de la $1150 - 1075\text{ cm}^{-1}$ spre $1100 - 939\text{ cm}^{-1}$. Această deplasare sugerează deprotonarea grupelor funcționale $-OH$ și participarea acestora în legarea fierului prin intermediul reacțiilor de schimb ionic.

Astfel, prin aplicarea spectroscopiei FTIR au fost identificate reacțiile ce stau la baza procesului de adsorbție a ionilor de fier (III) de către biomasa *Dunaliella salina*, acestea fiind reacțiile de schimb ionic și de complexare cu participarea unor structuri moleculare de tip proteină.

3. STUDII FIZICO-CHIMICE ALE PROTEINELOR IMPLICATE ÎN PROCESUL DE SINTEZĂ MICROBIOLOGICĂ

Sinteza microbiologică este o metodă eficientă de obținere a nanoparticulelor cu morfologie controlată pentru aplicații bio-medicale [33]. Acest procedeu necesită o atenție deosebită întrucât implică utilizarea microorganismelor pentru sinteza particulelor de dimensiuni nanometrice. Mecanismele biochimice și moleculare care stau la baza sintezei microbiologice nu sunt pe deplin cunoscute, deoarece celulele microorganismelor se comportă în mod diferit față de ionii metalelor prezenți în mediul celular, iar procesele metabolice implicate diferă și ele între speciile microorganismelor. Entitățile biologice sintetizează cantități mari de proteine responsabile de reducerea ionilor metalici și legarea acestora în mediul extracelular [34]. Studiarea mecanismului interacțiunii structurilor proteice cu ionii de fier va contribui la înțelegerea și optimizarea procesului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor de fier. Pentru realizarea obiectivelor propuse în capitolul 3 a fost selectată molecula de lactoferină.

În capitolul 3, au fost studiate structura și proprietățile specifice care determină interacțiunea lactoferinei umane cu ionii de Fe(III), prin aplicarea tehnicilor computaționale și experimentale. Pentru realizarea acestui studiu, au fost utilizate structuri din Bazele de Date pentru Proteine și pachete de programe de simulare și analiză: H++ server, PDB2PQR server, APBS și VMD și tehnici experimentale precum spectroscopia UV-VIS, FTIR și metoda de împrăștierea la unghiuri mici cu raze-X. Au fost elaborate o serie de protocoale de cercetare și caracterizare structurală a lactoferinei umane.

Lactoferina este o glicoproteină monomer cu masa moleculară în jur de 80 kDa, responsabilă pentru legarea ionilor de Fe(III) în fluidele fiziologice. Lactoferina constă dintr-un singur lanț polipeptidic alcătuit din 600-700 aminoacizi organizați în structuri de tip α -helix și foaie β -pliată. Lanțul polipeptidic al lactoferinei este pliat în doi lobi elipsoidali (N și C) conectați printr-un helix (Figura 3.1.A). Fiecare lob este divizat în două subdomenii, lobul N în N1 și N2, iar lobul C este divizat în subdomeniile C1 și C2 (Figura 3.1.B). Lobii N și C dispun de câte un centrul activ în care ionul de fier este fixat de resturi ale patru aminoacizi: acidul aspartic, două molecule de tirozină și o histidină (Figura 3.1.C). Fiecare moleculă de lactoferină poate lega doi atomi de fier trivalent, iar în funcție de nivelul de saturație cu fier se pot distinge

trei forme ale lactoferinei: apolactoferina (forma fără fier), lactoferina monofERICĂ (Figura 3.1.A) și lactoferina diferică (hololactoferina) (Figura 3.1.B). Specificitatea procesului de legare a ionilor de Fe(III) se datorează participării ionilor de carbonat. Anionul de carbonat trebuie să fie fixat în centrul activ al proteinei pentru a asigura legarea ionilor de Fe(III). Lactoferina posedă numeroase funcții biologice, care derivă din caracteristicile structurale ale acesteia precum și din funcția de bază, de legare a ionilor de fier. Datorită acest motiv, cercetarea proprietăților lactoferinei este un domeniu de interes remarcabil, iar studierea mecanismelor de acțiune ale acesteia va contribui la înțelegerea procesului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor de fier, dar și la elaborarea unor metodologii pentru aplicații biotehnologice în medicină.

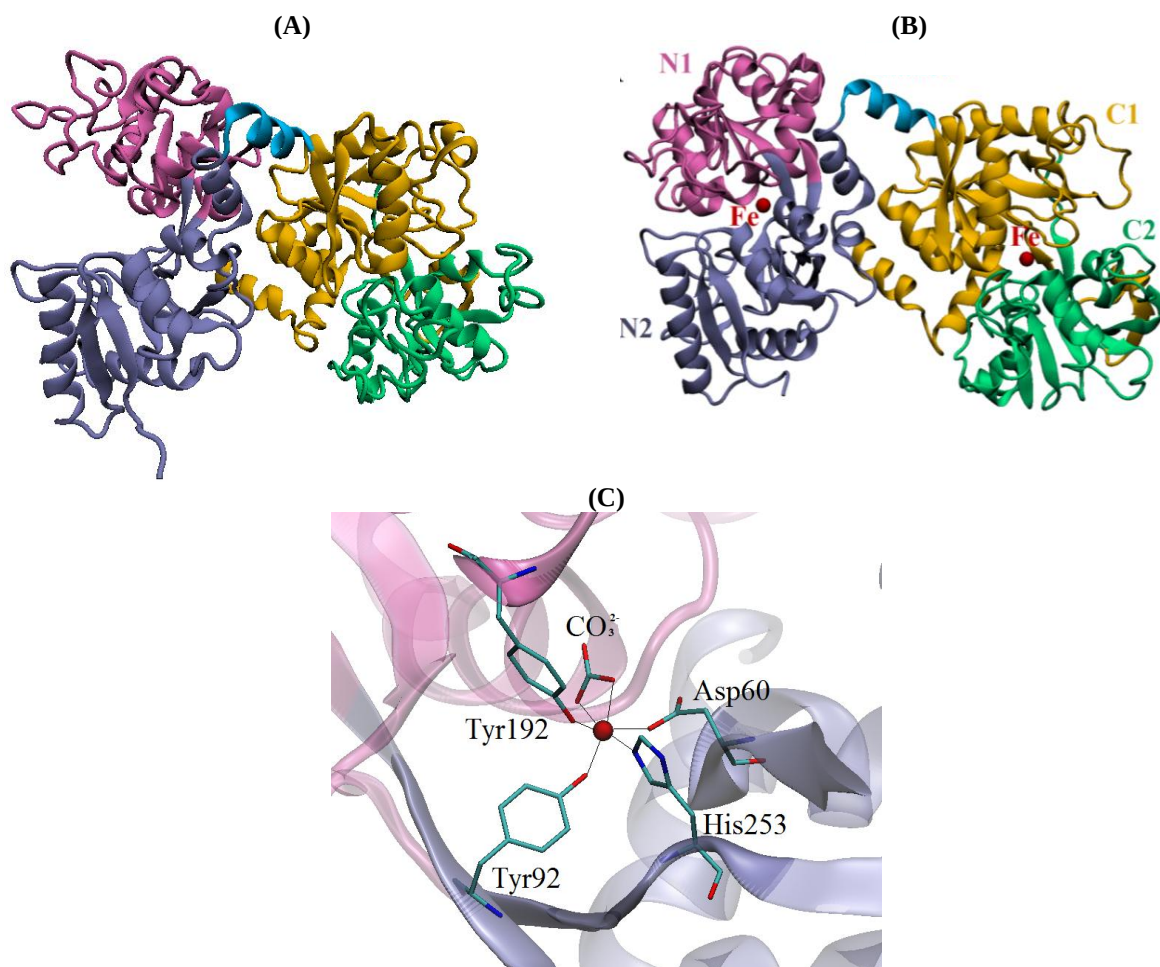


Fig. 3.1. Reprezentarea grafică a: (A) lactoferinei monofERICĂ (1LHF.pdb); (B) lactoferinei diferică (1B0L.pdb); (C) sferei de coordinare a ionului de fier (III) în lobul N al lactoferinei de către reziduurile aminoacizilor.

Pentru cercetarea structurii și mecanismului de interacțiune a lactoferinei cu ioni de Fe(III), au fost utilizate metode de *grafică moleculară* și *aliniere multiplă* cu pachetul de programe *Visual Molecular Dynamics*, au fost calculate constantele de aciditate ale resturilor de aminoacizi ai lactoferinei, a fost calculat potențialul electrostatic pe suprafață cu pachetul de

programe APBS, a fost aplicată metoda de împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X (SAXS) și spectroscopia în domeniile UV-VIS și IR.

A fost cercetat gradul de similitudine dintre moleculele de lactoferină diferică umană, bivolină, bovină, cabalină și de cămilă utilizând metoda de *alinie multiplă* a secvențelor [35]. S-a stabilit că structura lactoferinei umane este bine conservată printre speciile cercetate, cu excepția moleculei de lactoferină de cămilă. În cazul lactoferinei de cămilă, valoarea parametrului de omologie structurală per reziduu (Q_H) este mai mică comparativ cu celelalte lactoferine, Q_H este 0,3869 și identitatea procentuală este 30,60 %. *Alinierea de secvență* arată că lactoferina de cămilă diferă nu doar în compoziția chimică, ci și din punct de vedere al aranjamentului aminoacizilor în molecula proteică (RMSD=12,6343).

Modelul de rezoluție înaltă al lactoferinei umane (codul PDB 1B0L), preluat din Banca de Date pentru Proteine, a fost validat experimental (Figura 3.2) prin metoda de împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X (SAXS). Măsurătorile au fost efectuate la fascicolul de radiație X33 al inelului de accelerare Doris, la sincrotronul DESY (Deutsches Elektronen-Synchrotron) din Hamburg, Germania.

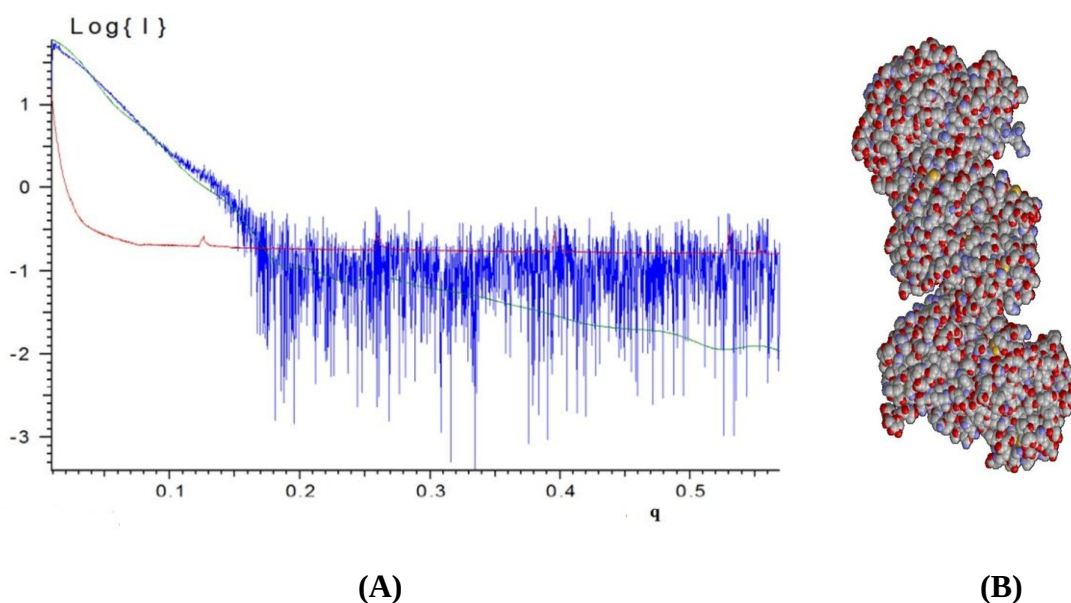


Fig. 3.2. Modelarea homodimerului de rezoluție înaltă al lactoferinei:
(A) procedura de fitare a curbei SAXS; (B) modelul 3D al homodimerului obținut.

Au fost studiate procesele de protonare-deprotonare ale resturilor aminoacizilor din structura lactoferinei și au fost identificați aminoacizii implicați direct în legarea sau eliberarea ionilor de Fe(III), utilizând modelul electrostatic continuu Poisson-Boltzmann [36]. Evaluarea valorilor constantelor de aciditate (pK_a) ale resturilor de aminoacizi din structura lactoferinei, a evidențiat faptul că legarea sau eliberarea ionilor de fier este permisă doar pentru anumite stări

de protonare ale aminoacizilor din centrii activi ai proteinei. În plus, arginina din poziția 121 și arginina din poziția 210 suferă modificări ale valorilor pK_a cu 4 pK unități, de la forma deschisă spre forma închisă a lactoferinei, subliniind importanța participării resturilor aminoacidului din cele două poziții în procesul de închidere / deschidere al proteinei.

Prin metoda de calcul al potențialului electrostatic pe suprafață, a fost studiată lactoferina umană în conformația deschisă și închisă. Figura 3.3 prezintă potențialul electrostatic pe suprafață calculat pentru apolactoferina în conformația închisă și deschisă la pH 7,4 (în negru sunt prezentate suprafețele încărcate negativ, iar în gri, suprafețele încărcate pozitiv). Analiza rezultatelor obținute arată că tranziția de la forma deschisă la forma închisă rezultă în redistribuirea sarcinii negative pe suprafața moleculei proteice.

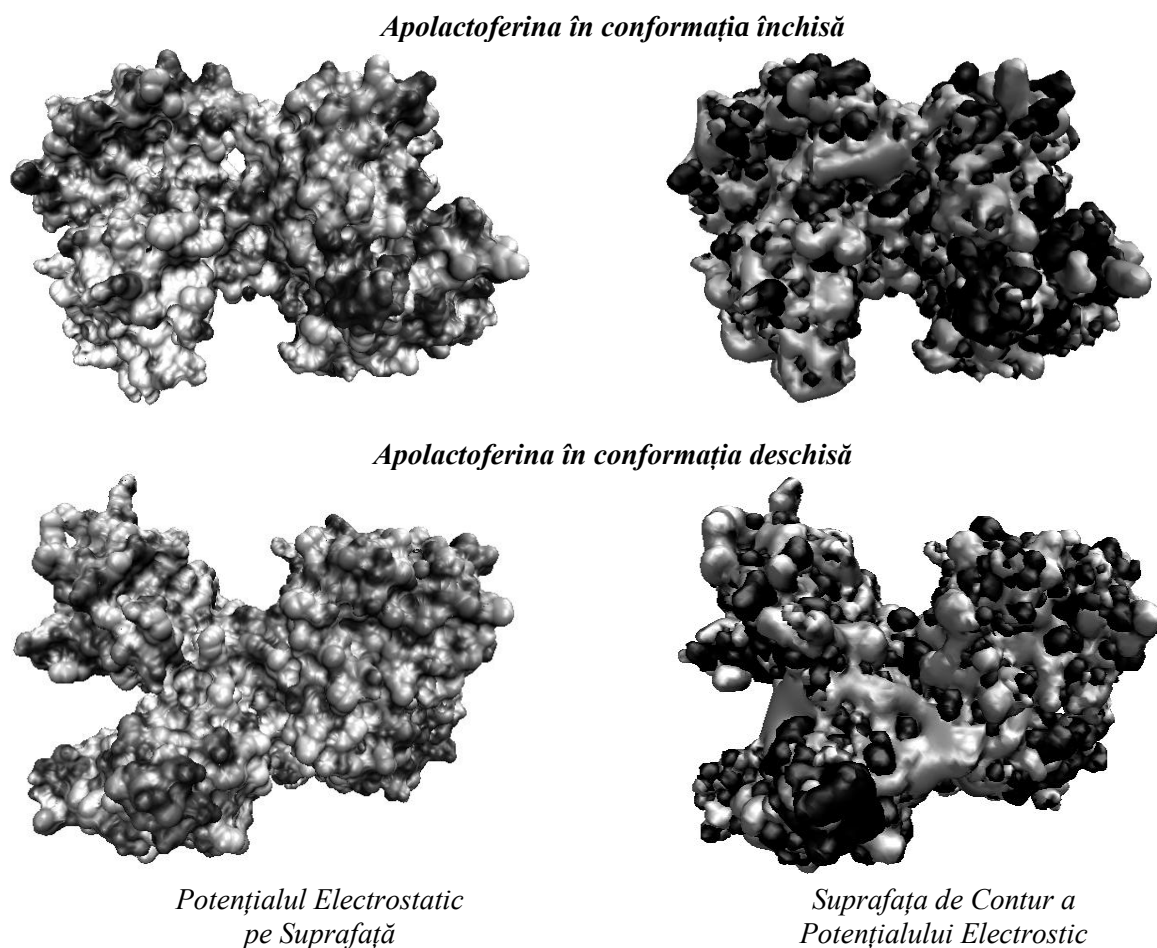


Fig. 3.3. Reprezentarea grafică a distribuției potențialului electrostatic mapat pe suprafața moleculei de apolactoferină în conformația închisă și deschisă.

De asemenea, prin metoda de calcul al potențialului electrostatic pe suprafață, a fost stabilită dependența conformației lactoferinei de valoarea pH-ului mediului. Micșorarea pH-ului mediului conduce la modificarea potențialului electrostatic pe suprafață, iar odată cu micșorarea

pH-ului crește sarcină pozitivă a proteinei (Figura 3.4). Rezultatele obținute relevă faptul că extinderea regiunilor de sarcină pozitivă pe suprafața proteinei va crea respingerea electrostatică între resturile aminoacizilor din structura proteinei inclusiv și a celor din centrii activi, provocând deschiderea lobului și eliberarea ionului de fier.

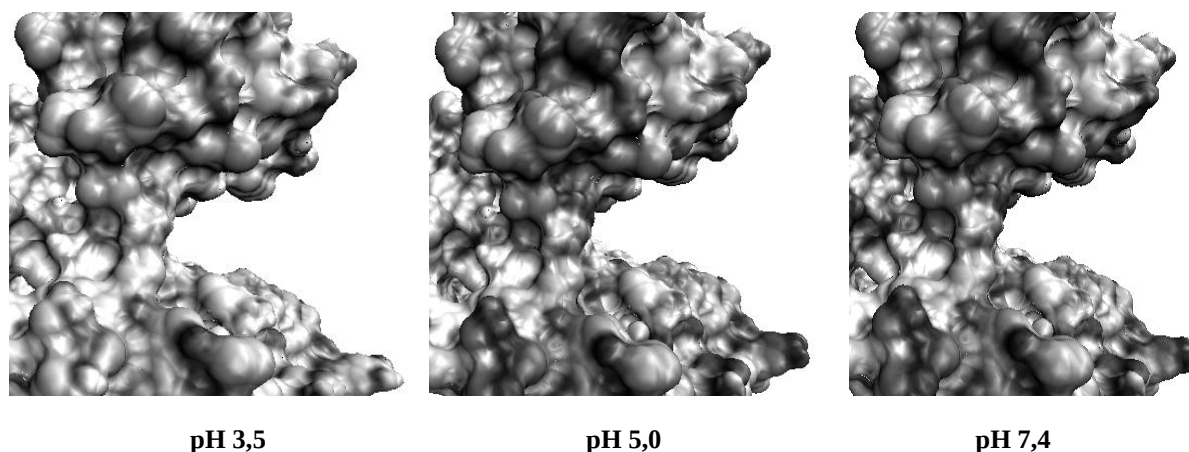


Fig. 3.4. Reprezentarea grafică a distribuției potențialului electrostatic pe suprafață, în funcție de pH, în centrul activ din lobul N al proteinei în forma deschisă.

Analiza spectrală în domeniul IR a fost utilizată pentru evidențierea aminoacizilor din proteină și a structurilor secundare ce determină conformația proteinei. Rezultatele acestui studiu au permis identificarea resturilor de aminoacizi-cheie precum histidina, tirozina și acidul aspartic (Tabelul 3.1). Semnalul înregistrat la $1631,3 \text{ cm}^{-1}$ a fost desemnat vibrației de întindere $\text{C}=\text{C}$ a histidinei, peak-ul înregistrat se suprapune cu peak-ul caracteristic benzii grupării amide primare (Tabelul 3.1). Conform literaturii de specialitate, gruparea carboxilică a acidului aspartic prezintă un maxim de absorbție în apropierea 1402 cm^{-1} , însă poziția peak-lui se deplasează cu $+60/-90 \text{ cm}^{-1}$ în prezența cationului metalic [37]. În spectrul FTIR înregistrat pentru lactoferina umană semnalul apare la $1392,5 \text{ cm}^{-1}$, fiind deplasat cu $9,5 \text{ cm}^{-1}$ de la valoarea indicată în literatură, ceea ce demonstrează implicarea grupării carboxil a acidului aspartic în formarea legăturii chimice cu ionul de Fe(III) (Tabelul 3.1). Tirozina a fost identificată prin trei semnale caracteristice la $1516,2$; $1236,3$ și $1165,5 \text{ cm}^{-1}$ (Tabelul 3.1). Semnalul primar al tirozinei înregistrat la $1516,2 \text{ cm}^{-1}$ este atribuit stării de protonare a tirozinei [37], iar în forma deprotonată peak-ul se deplasează la 1500 cm^{-1} . Vibrația din apropierea 1270 cm^{-1} este asociată stării ionizate a tirozinei, pe când peak-ul din regiunea $1235\text{-}1270 \text{ cm}^{-1}$ aparține tirozinei protonate, fiind asociat cu semnalul secundar. Banda înregistrată la $1165,5 \text{ cm}^{-1}$ este semnalul terțiar al tirozinei, fiind asociat cu vibrația de deformare C-OH din regiunea 4-metilfenol [37].

Tabelul 3.1. Frecvențele de vibrație ale resturilor de aminoacizi din centrul activ al complexului Fe(III)-lactoferină umană, identificate în spectrul FTIR

Vibrații	Numere de undă (cm ⁻¹)	
	Date experimentale	Date din literatură [37]
Histidina, vibrația de întindere C=C din inelul imidazol	1631,3	1631
Amida primară, vibrația de întindere C=O		1690 - 1600
Tirozina, vibrația de întindere CC și vibrația de deformare C-H din regiunea 4-metilfenol	1516,2	1516-1518
Amida secundară, vibrația de întindere C-N		1575 - 1480
Acidul aspartic, vibrația de întindere C-O din gruparea carboxilică	1392,5	1402, poziția benzii se deplasează cu +60/-90 cm ⁻¹ în prezența cationului metalic
Tirozina, vibrația de întindere C-O și CC din regiunea 4-metilfenol	1236,3	1235-1270
Amida terțiară, vibrația de întindere C-N		1301 - 1229
Tirozina, vibrația de deformare C-OH din regiunea 4-metilfenol	1165,5	1169-1260

De asemenea, prin spectroscopia FTIR au fost evidențiate structurile secundare α -helix și β -pliate din componența lactoferinei, care influențează direct mobilitatea proteinei. Semnalele înregistrate la 1631,3 cm⁻¹, 1528,9 cm⁻¹ și 1236,3 cm⁻¹ sunt atribuite structurilor de tip foaie β -pliată și întoarcere- β (Tabelul 3.2).

Prezența structurilor de tip α -helix în spectrul înregistrat a fost confirmată doar prin semnalul secundar înregistrat la 1305,2 cm⁻¹, întrucât semnalul principal caracteristic acestui tip de structuri secundare în banda amidei primare de la 1654 cm⁻¹ [37] este înglobat în banda structurilor de tip β -pliate.

Tabelul 3.2. Structurile secundare din molecula complexului Fe(III)-lactoferină umană

Structura secundară	Numere de undă (cm ⁻¹)	
	Date experimentale	Date din literatură [37]
	<i>Banda amidei primare (1690 - 1600cm⁻¹)</i>	
Structurile de tip foaie β -pliată	1631,3	1623-1641
Structurile de tip α -helix	1305,2	1648-1657, 1305
	<i>Banda amidei secundare (1575 - 1480cm⁻¹)</i>	
Structurile de tip foaie întoarcere- β (β -turn)	1528,9	1528, 1577
	<i>Banda amidei terțiare (1301 - 1229cm⁻¹)</i>	
Structurile de tip foaie β -pliată	1236,3	1235-1270

Analiza de *grafică moleculară* a structurii lactoferinei umane, determinată experimental cu ajutorul de difracției de raze-X (fișierul 1B0L.pdb), completează rezultatele analizei spectrale în domeniul IR, privind structurile secundare din molecula complexului Fe(III)-lactoferină umană.

4. SIMULĂRI DE DINAMICĂ MOLECULARĂ

În capitolul 4, aspectele mecanismului de sinteză a nanoparticulelor pe baza de fier cu participarea microorganismelor au fost studiate prin modelare de dinamică moleculară. Această metodă de studiu a fost aplicată pe familia de transferine - proteinele responsabile de legarea ionilor de fier din mediul celular și transportarea acestora în interiorul celulei microorganismului. Pentru aceste studii a fost selectată molecula de lactoferină, membru al familiei de transferine.

Obiectivele formulate în cadrul acestui capitol constau în studierea stabilității lactoferinei în diferite conformații și evaluarea rolului unor resturi de aminoacizi din structura proteică, din apropierea sferei de coordonare a ionilor metalului din centrul activ al lactoferinei pentru a descrie structura și mecanismul de interacțiune al lactoferinei cu ioni de Fe(III) prin aplicarea metodei de simulare de dinamică moleculară. Pentru realizarea acestui studiu au fost utilizate structuri preluate din Banca de Date pentru Proteine și pachete de programe de simulare și analiză: GROMACS, XmGrace, VMD. În acest capitol a fost elaborat protocolul de cercetare și evaluare a calității experimentelor de simulare de dinamică moleculară pentru sisteme în care se conțin macromolecule organice de tip proteină.

Simulările de dinamică moleculară s-au desfășurat la temperatura de 300 K și lungimea traiectoriilor rezultate a fost de 5 ns pentru fiecare model molecular. Timpul real dedicat pentru fiecare experiment de simulare de dinamică moleculară a constituit aproximativ 61 ore de calcul. Traectoria sistemelor simulate a fost analizată pentru atomii de carbon C α , care constituie primul atom de carbon atașat de gruparea funcțională din structura aminoacidului. Evaluarea calității experimentelor de simulare de dinamică moleculară a fost realizată prin verificarea evoluției în timp a energiei potențiale, temperaturii, presiunii și densității sistemului cercetat.

Evaluarea stabilității lactoferinei în diferite conformații s-a realizat prin experimente de simulare de dinamică moleculară a sistemelor modelate: apolactoferina deschisă (S1), apolactoferina închisă (S2), apolactoferina în conformația închisă cu ioni de carbonat în centrul activ (S3) și hololactoferina (lactoferina în conformația închisă, cu ioni de carbonat și fier (III) în centrul activ) (S4). Evoluția devierii medii pătratice (RMSD) în experimentele de simulare prezintă fluctuații cuprinse între 1,0 Å și 3,8 Å (Figura 4.1). Reieșind din rezultatele obținute

remarcăm faptul că cea mai stabilă este structura lactoferinei din sistemul S3, iar cea mai puțin stabilă este lactoferina din sistemul S4.

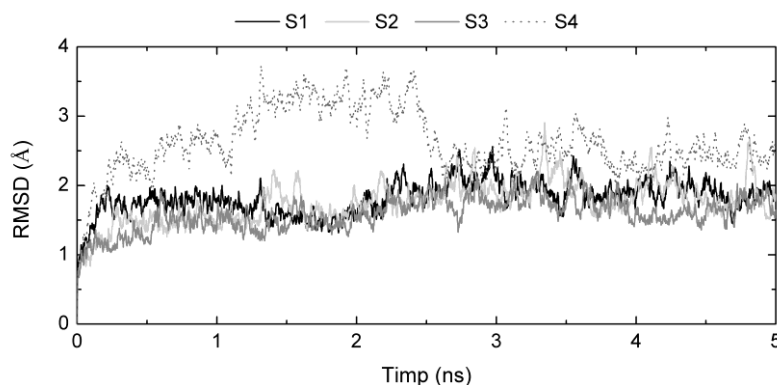


Fig. 4.1. Evoluția devierii medii pătratice (RMSD) ale atomilor $C\alpha$ din structura lactoferinei pe întreaga perioadă a simulării de dinamică moleculară, pentru sistemele studiate.

Din analiza fluctuațiilor medii pătratice (Figura 4.2) rezultă că la pH-ul fiziologic lactoferina saturată cu fier (S4) suferă cele mai notabile fluctuații ale resturilor de aminoacizi din structura proteinei. Acest rezultat corespunde cu observațiile analizei evoluției devierii medii pătratice. Prezența fierului în sistem creează perturbații de natură electrostatică, rezultând în modificări ale pozițiilor resturilor de aminoacizi din structura proteinei pe perioada simulărilor.

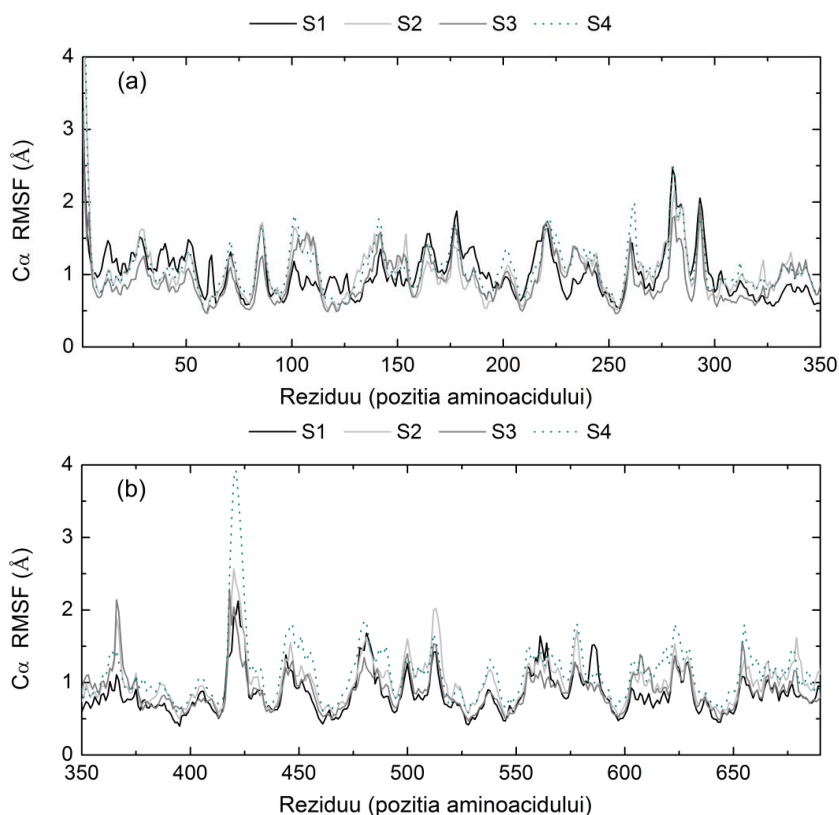


Fig. 4.2. Evoluția fluctuațiilor medii pătratice (RMSF) ale atomilor $C\alpha$ din structura lactoferinei pe întreaga perioadă a simulării de dinamică moleculară ale celor patru sisteme: (a) pentru aminoacizii din pozițiile 1-350 în structura lactoferinei, (b) pentru aminoacizii din pozițiile 350-690 în structura lactoferinei.

Compararea evoluției ariei suprafeței accesibile solventului (SASA) pe întreaga perioadă a simulărilor de dinamică moleculară a arătat că sistemul (S2) cu apolactoferina în conformația închisă suferă cele mai mari fluctuații (Figura 4.3). Această observație susține ideea că apolactoferina în conformația închisă este cel mai puțin stabilă, iar rearanjarea conformațională locală este necesară pentru stabilizarea moleculei.

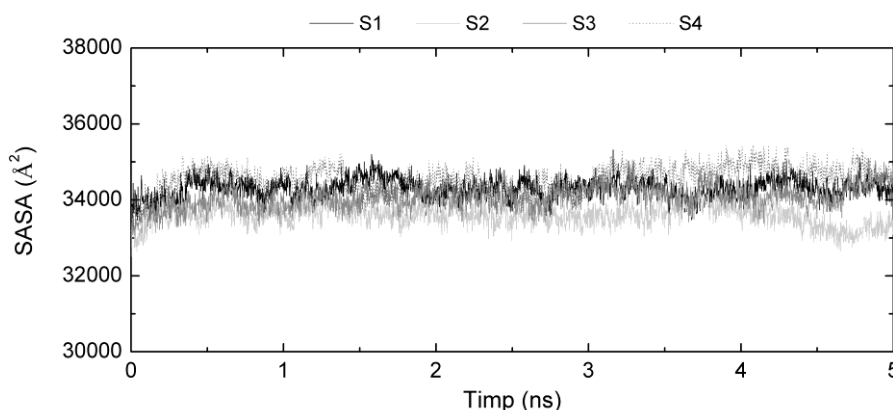


Fig. 4.3. Evoluția ariei suprafeței accesibile solventului (SASA) calculate pentru traiectorii de 5 ns ale celor patru sisteme cercetate.

Pentru a obține o informație mai exactă despre modificările pe care le suferă aminoacizii din sfera de coordinare primară, din sistemele supuse simulărilor de dinamică moleculară, au fost examinate distanțele dintre aminoacizii-cheie. În Figura 4.4 se exemplifică evoluția distanțelor dintre resturile aminoacizilor Arg-121:Tyr-92, Arg-121:Tyr-192, His-253:Asp-60 și Tyr-92:Asp-60 pe perioada simulărilor de dinamică moleculară. S-a observat că absența fierului în sistem nu induce modificări vizibile în conformația proteinei, pe când absența ionilor de carbonat induce distanțarea resturilor de aminoacizi, ca rezultat lobul N al lactoferinei se deschide. Compararea distanțelor, înregistrate pentru seturile de aminoacizi din sfera primară de coordinare și cea secundară, susține observația expusă anterior. Cele mai notabile distanțări se petrec între seturile de aminoacizi precum Tyr-90 și Asp-60, Tyr-192 și Asp-60, Tyr-192 și Arg-121, His-253 și Asp-60, His-253 și Tyr-92 variind între 1.9 și 4.0 Å. Astfel, eliberarea ionilor de carbonat din structura proteinei induce tranziția structurală de la forma închisă spre forma deschisă a lactoferinei.

Pentru evaluarea rolului unor resturi de aminoacizi din structura proteică a fost aplicată metoda de simulare de dinamică moleculară. În acest sens au fost modelate două sisteme moleculare adiționale: hololactoferina din structura căreia a fost îndepărtată arginina din poziția 121 (S5) și hololactoferina fără arginina din poziția 210 (S6). Rezultatele experimentelor de dinamică moleculară ale acestor sisteme au fost comparate cu rezultatele obținute pentru sistemul (S4). Compararea evoluției devierii medii pătratice pentru lactoferina din cele trei

sisteme modelate (S4, S5, S6) arată că absența argininei din poziția 121, cât și a celei din poziția 210 induce modificări ale conformației închise a lactoferinei.

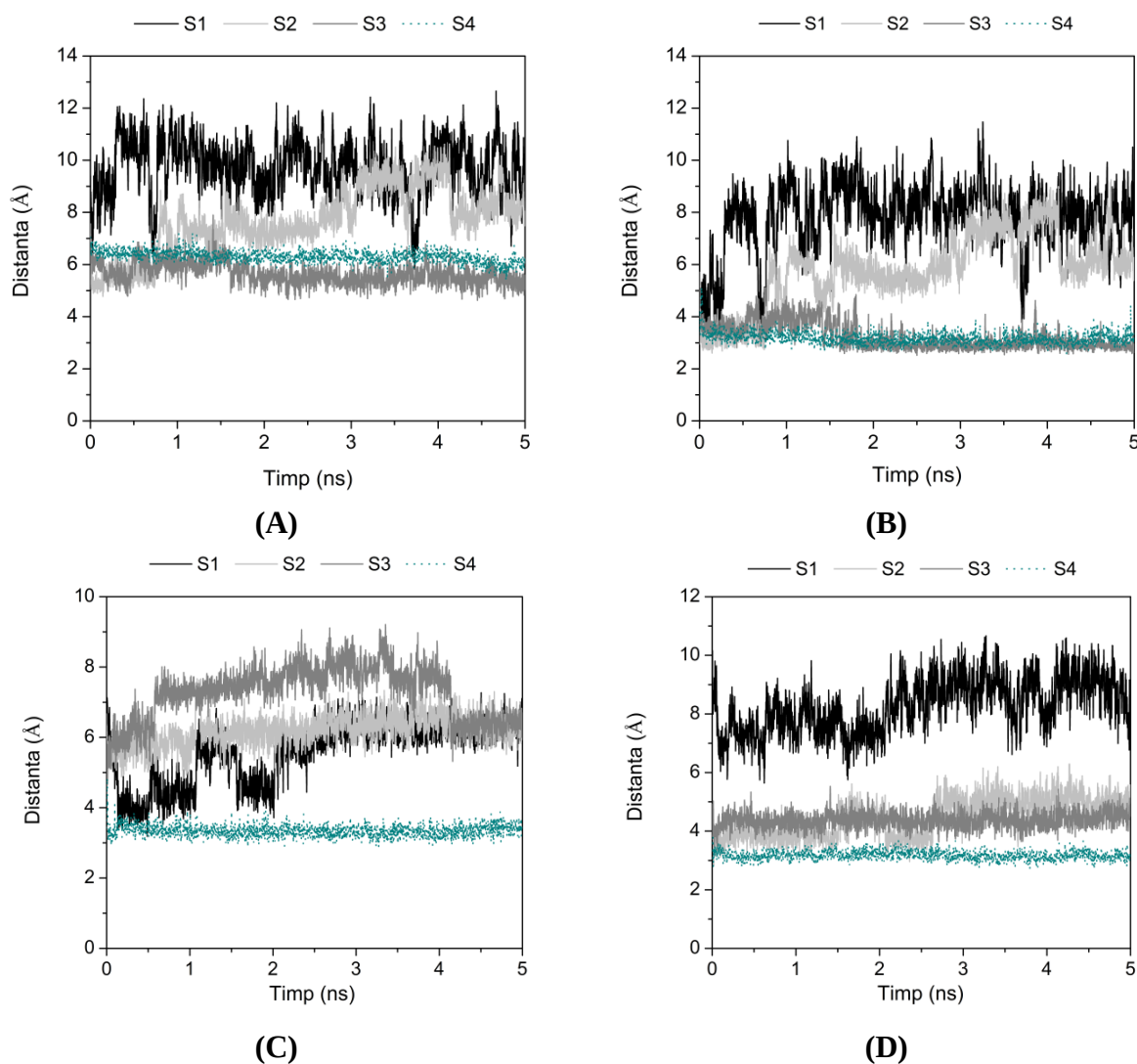


Fig. 4.4. Evoluția distanței dintre resturile aminoacizilor: (A) arginina din poziția 121 și tirozina 92; (B) arginina din poziția 121 și tirozina 192; (C) histidina din poziția 253 și acidul aspartic 60; (D) tirozina din poziția 92 și acidul aspartic 60.

Modificările structurale ale conformației lactoferinei au fost observate și din analiza comparativă a fluctuațiilor medii pătratică. Cele mai notabile fluctuații au fost înregistrate în lobul N al lactoferinei din sistemul molecular, în care se conține hololactoferina fără arginina în poziția 210 (S6), ceea ce conduce la concluzia că mutația argininei din poziția 210 cauzează o restructurare locală a aminoacizilor din lobul N.

Analiza evoluției ariei suprafeței accesibilă solventului (SASA) pe perioada simulărilor de dinamică moleculară a arătat că hololactoferina din structura căreia a fost îndepărtată arginina din poziția 121 (S5) prezintă modificări la suprafață. Aceste modificări sunt asociate cu

restructurarea conformației lactoferinei în decursul tranziției de la forma închisă spre forma deschisă a lobului N, indusă de absența argininei din poziția 121. Arginina din poziția 121 este responsabilă de fixarea ionului de carbonat în centrul activ al lobului N al lactoferinei, iar mutația acestui aminoacid în secvența proteică cauzează deplasarea ionului de carbonat în centrul activ al proteinei, rezultând în destabilizarea structurală a conformației lactoferinei.

Prin aplicarea tehnicii de simulare de dinamică moleculară au fost aduse dovezi suplimentare despre comportamentul lactoferinei și mecanismul de interacțiune cu ionii de Fe(III). Rezultatele simulărilor de dinamică moleculară și calculele constantelor de aciditate ale aminoacizilor, împreună cu datele din literatură, sugerează mecanismul de legare a ionului de Fe(III) în centrul activ al lobului N al lactoferinei umane, prin reacția de complexare dintre aminoacizii histidină (His-253), acid aspartic (Asp-60) și tirozină (Tyr-92 și Tyr-192), și ionul de carbonat stabilizat de arginină (Arg-121) (Figura 4.5).

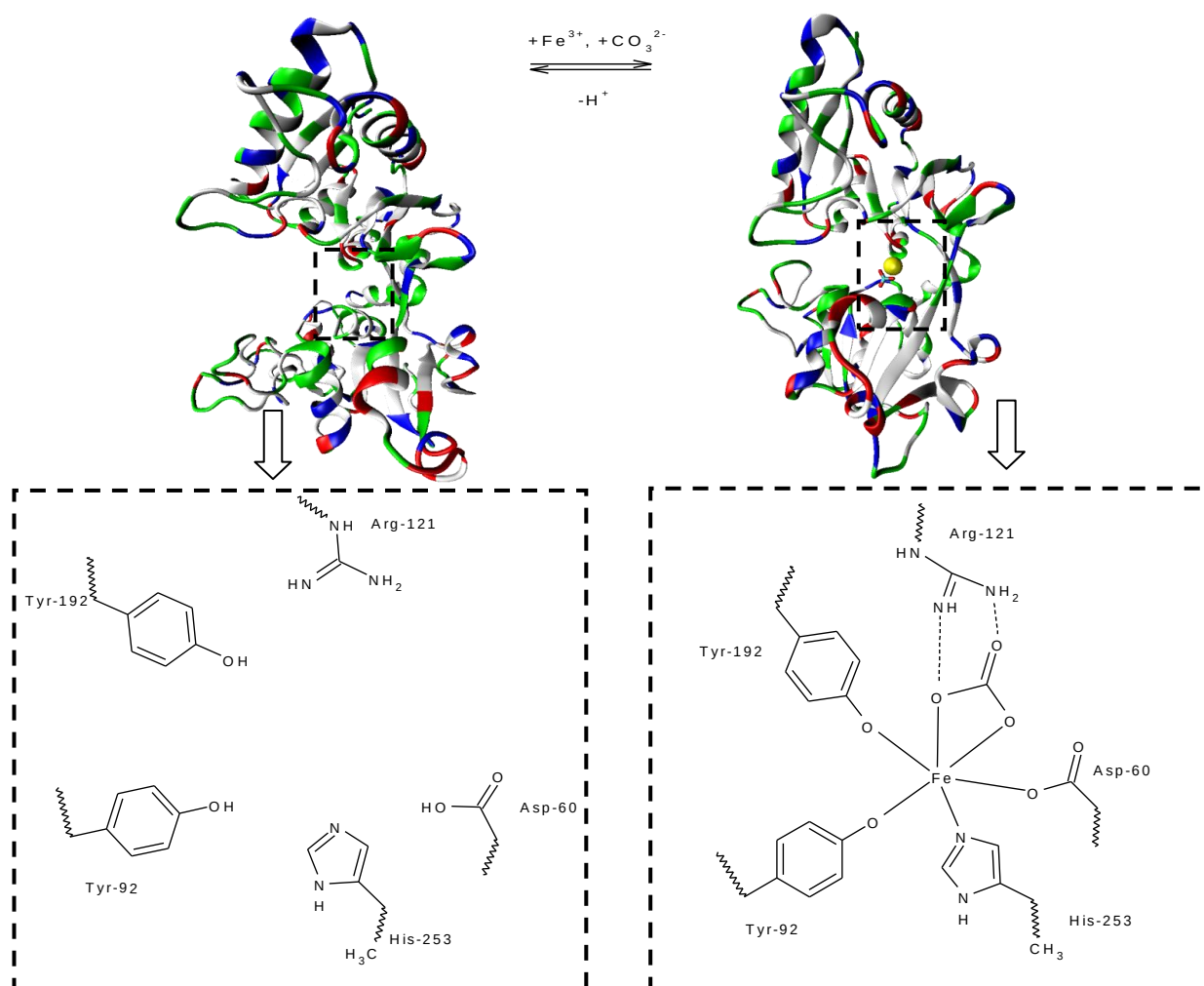


Fig. 4.5. Reprezentarea schematică a procesului de legare a ionului de Fe(III) în centrul activ al lobului N al lactoferinei umane, prin reacția de complexare.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Prezenta teză de doctorat și-a propus studiul aspectelor fizico-chimice și simulări de dinamică moleculară ale procesului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor de fier cu utilizarea tulpinii de microalge verzi *Dunaliella salina* CNM-AV-02.

Rezultatele originale obținute în cadrul prezentului studiu au permis formularea următoarelor concluzii:

- Au fost cercetați factorii operaționali și identificate condițiile optime pentru sinteza nanoparticulelor de fier (III) în celulele vii ale tulpinii de microalge verzi *Dunaliellei salina*. În acest sens, s-a stabilit că pentru un timp de contact de 45 min procesul de sorbție microbiologică a ionilor de Fe(III) decurge favorabil la un pH de 8,0, pentru intervalul de concentrații de citrat de fier (III) 0,3-2,5 mM în 50 mM HEPES și 0,35 g/L concentrație a biomasei celulare vii cultivate în mediu deficitar de fier.
- Procesul de sorbție microbiologică a ionilor de Fe(III) a fost descris cu ajutorul modelelor izotermelor de adsorbție Langmuir, Freundlich și Dubinin-Radushkevich. Conform rezultatelor de fitare a datelor experimentale cu ecuațiile liniare ale modelelor studiate, modelul Freundlich descrie cel mai bine ($R^2=0,9881$) procesul de sorbție a ionilor de Fe(III) de către microalga *Dunaliella salina*, în intervalul de concentrații de 0,3-2,5 mM citrat de fier (III).
- Utilizând spectroscopia FTIR, a fost stabilită implicarea grupelor funcționale ale proteinelor și polizaharidelor, sintetizate de celulele vii ale *Dunaliellei salina* CNM-AV-02, în procesul de legare a ionilor de Fe(III). Acest rezultat indică faptul că reacțiile care stau la baza procesului de sorbție microbiologică a ionilor de fier sunt reacțiile de schimb ionic și complexare cu participarea unor structuri moleculare de tip proteină.
- Studiul mecanismelor procesului de sinteză microbiologică la nivel unimolecular a fost realizat prin cercetarea interacțiunii moleculei de lactoferină cu ionii de Fe(III) cu aplicarea tehnicilor experimentale și computaționale. A fost determinată influența unor factori, precum starea de protonare a aminoacizilor din sfera de coordinare primară, dar și a argininei din poziția 121 și 210, și lizinei din poziția 301 din secvența proteică a lactoferinei, asupra procesului de legare ionilor de Fe(III) pe centrul activ al proteinei.
- Capacitatea lactoferinei de legare a fierului depinde de proprietățile de suprafață ale acesteia și de valoarea pH-ului mediului. Valoarea pH-ului optim ce favorizează interacțiunea lactoferinei cu ionii de Fe(III) este de 7,0-8,0.

- A fost demonstrată eficiența metodei de simulare de dinamică moleculară în studierea proprietăților fizico-chimice ale proteinelor. Prin aplicarea tehnicii de simulare de dinamică moleculară au fost aduse dovezi suplimentare despre comportamentul lactoferinei și mecanismul de interacțiune cu ionii de Fe(III).
- Rezultatele demonstrează importanța ionilor de carbonat în stabilizarea centrilor activi pe care se leagă ionii de Fe(III). De asemenea, evidențiază că arginina din poziția 121 este responsabilă de fixarea ionului de carbonat pe centrul activ al lobului N al lactoferinei, iar mutația acestui aminoacid în secvența proteică cauzează deplasarea ionului de carbonat în centrul activ al proteinei, rezultând în destabilizarea structurală a conformației lactoferinei.

Problema științifică soluționată constă în identificarea mecanismelor ion-moleculare care stau la baza procedurii dirijată de sinteză a nanoparticulelor de fier cu utilizarea tulpinii de microalge verzi *Dunaliella salina* CNM-AV-02.

Recomandări practice:

- Metodologia studiului de sorbție microbiologică, elaborată în cadrul acestei teze de doctorat, se recomandă ca un protocol de cercetare privind testarea microorganismelor pentru identificarea capacității de producere a nanoparticulelor metalice.
- În cadrul testării capacității microorganismelor de a sintetiza nanoparticule metalice, se recomandă evaluarea factorilor precum timpul de contact, cantitatea de biomasa utilizată, valoarea pH-ului inițial, concentrația inițială a ionilor metalici în mediu, prezența altor specii în mediu, efectul compoziției mediului de cultivare a microorganismelor.
- Se recomandă utilizarea spectroscopiei în infraroșu în cercetarea biomasei celulare uscate pentru identificarea modificărilor biochimice produse în compoziția acestora la variația factorilor de mediu.
- Protocolul de cercetare pentru realizarea experimentelor de simulare de dinamică moleculară, elaborat în cadrul prezentei teze de doctorat, se recomandă pentru studierea macromoleculelor de tip proteină.

Cercetările fundamentale și aplicative derulate în cadrul acestei teze de doctorat oferă posibilitatea evaluării capacității microorganismelor de a sintetiza nanoparticule metalice, dar și optimizarea metodelor microbiologice existente pentru modificarea dirijată a parametrilor fizico-chimici ai nanoparticulelor de interes științific.

BIBLIOGRAFIE

1. Wu W. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. In: Nanoscale Research Letters, 2008, 3, p. 397-415.
2. Huber, D.L. Synthesis, Properties, and applications of iron nanoparticles. In: Small, 2005, 1, p. 482–501.
3. Mohapatra M., Anand S. Synthesis and applications of nano-structured iron oxides/hydroxides – a review. In: International Journal of Engineering, Science and Technology, 2010, 2(8), p. 127-146.
4. Basly B. et al. Effect of the nanoparticle synthesis method on dendronized iron oxides as MRI contrast agents. In: Dalton transactions, 2003, 42, p. 2146-2157.
5. Balu A. et al. Versatile low-loaded mechanochemically synthesized supported iron oxide nanoparticles for continuous flow alkylations. In: RSC Advances, 2013,3, p. 16292-16295.
6. Sun S., Zeng H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. In: Journal of the American Chemical Society, 2002, 124(28), p. 8204-8205.
7. Huang K.-Ch., Ehrman S.H. Synthesis of iron nanoparticles via chemical reduction with palladium ion seeds. In: Langmuir, 2007, 23(3), p. 1419–1426.
8. Xu Z.Z. et al. Synthesis of superparamagnetic Fe₃O₄/SiO₂ composite particles via sol-gel process based on inverse miniemulsion. In: Journal of Materials Science, 2005, 40(17), p. 4667-4669.
9. Mascolo M.C. et al. Room temperature co-precipitation synthesis of magnetite nanoparticles in a large pH window with different bases. In: Materials, 2013, 6, p. 5549-5567.
10. Yeary L.W. et al. Magnetic properties of bio-synthesized magnetite nanoparticles. In: IEEE Transactions on Magnetics, 2005, 41, p. 4384-4389.
11. Baker R.A., Tatum J.H. Novel anthraquinones from stationary cultures of *Fusarium oxysporum*. In: Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 85, p. 359-361.
12. Homuth M. et al. Identification and characterization of a novel extracellular ferric reductase from *Mycobacterium paratuberculosis*. In: Infection and Immunity, 1998, 66, p. 710-716.
13. Sundaram P.A. et al. Extracellular biosynthesis of iron oxide nanoparticles by *Bacillus subtilis* strains isolated from rhizosphere soil. In: Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2012, 17, p. 835-840.
14. Abdeen S. et al. Evaluation of antimicrobial activity of biosynthesized iron and silver nanoparticles using the fungi *Fusarium oxysporum* and *Actinomyces* sp. on human pathogens. In: Nano Biomedicine and Engineering, 2013, 5(1), p. 39-45.
15. Hulkoti N.I., Taranath T.C. Biosynthesis of nanoparticles using microbes—A review. In: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, 121, p. 474-483.
16. Kitching M. et al. Fungal biosynthesis of gold nanoparticles: mechanism and scale up. In: Microbial biotechnology, 2014, p. 1-14.
17. Christensen L. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Murraya koenigii* (curry leaf): An investigation on the effect of broth concentration in reduction mechanism and particle size. In: Advanced Materials Letters, 2011, 2(6), p. 429-434.
18. Bansal V. et al. Biosynthesis of zirconia nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. Journal of Materials Chemistry, 2004, 14, p. 3303-3305.
19. Fesharaki P.J. et al. Biosynthesis of selenium nanoparticles using *Klebsiella pneumoniae* and their recovery by a simple sterilization process. In: Brazilian Journal of Microbiology, 2010, 41, p. 461-466.
20. Duca Gh., Zinicovscaia I. et al. Microalgae as possible silver "nanofactories". Book of Abstracts, 2nd International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, Chisinau, 2013, p. 433-434.

21. Zinicovscaia I. Study of the interaction of metals (Hg, Cr, Zn, Ag, Au) with *Arthrobacter genera* and *Spirulina platensis*. teză de doctor în chimie. Chişinău, 2013, 105 p.
22. **Anghel L.**, Duca Gh. A review of the biogenesis of iron nanoparticles using microorganisms and their applications. In: Chemistry Journal of Moldova, 2013, 8(2), p. 32-41.
23. Rai M., Duran N. Metal nanoparticles in microbiology. Springer-Verlag, 2011, 330 p.
24. **Anghel L.**, Balasoïu M., Ishchenko L., Stolyar S.V., Rogachev A., Kurkin T.S., Kuklin A.I., Raikher Yu., Iskhakov, R., Arzumanian G.M. SAXS studies of ultrasonicated dispersions of Biomineral particles produced by *Klebsiella oxytoca*. In: Journal of Solid State Phenomena, 2012, 190, p. 621-624.
25. **Anghel L.**, Balasoïu M., Ishchenko L., Stolyar S.V., Kurkin T.S., Kuklin A.I., Kovalev Yu.S., Raikher Yu., Iskhakov, R., Duca Gh. Characterization of bio-synthesized nanoparticles produced by *Klebsiella oxytoca*, In: Journal of Physics: Conference series, 2012, 351 (1) 012005.
26. Metzler D.E. Biochemistry. The chemical reactions of living cells. Second Edition. Elsevier Academic Press. 1973 p.
27. Rebhun S., Ben-Amotz A. Effect of NaCl concentration on cadmium uptake by the halophilic alga *Dunaliella salina*. In: Marine Ecology Progress Series, 1986, 30, p. 215-219.
28. Yamaoka Y. et al. Effects of various elements on arsenic accumulation of the alga *Dunaliella salina*. In: Applied Organometallic Chemistry, 1994, 8, p. 229-235.
29. Muhaemin M. The initial adsorption of Pb^{2+} to *Dunaliella salina*, In: COASTDEV, 2006, 9(2), p. 97-105.
30. Imani S. et al. Hg, Cd and Pb heavy metal bioremediation by *Dunaliella alga*. In: Journal of Medicinal Plants Research, 2011, 5(13), p. 2775-2780.
31. Akbarzadeh N., Shariati M. Aluminum remediation from medium by *Dunaliella*. In: Ecological Engineering, 2014, 67, p. 76-79.
32. Shafik M.A. Phytoremediation of some heavy metals by *Dunaliella salina*. In: Global Journal of Environmental Research, 2008, 2(1), p. 01-11.
33. Li X. et al. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. In: Journal of Nanomaterials, 2011, 16 p.
34. Krumov, N. et al. Production of inorganic nanoparticles by microorganisms. In: Chemical Engineering and Technology, 2009, 32(7), p. 1026–1035.
35. Anghel L. Lactoferrin: analysis of the structure profile. In: Chemistry Journal of Moldova, 2013, 9(2), p. 99-106.
36. **Anghel L.** An investigation of the protonation states of human lactoferrin iron-binding protein. In: Chemistry Journal of Moldova, 2013, 10(1), p. 70-74.
37. Barth A., Zscherp C. What vibrations tell us about proteins. In: Quarterly Reviews of Biophysics 2002, 35 (4), p. 369-430.
38. Adochitei A., Drochioiu G. Rapid characterization of peptide secondary structure by FT-IR spectroscopy. In: Revue Roumaine de Chimie, 2011, 56(8), p. 783-791.

LISTA DE PUBLICAȚII

Lucrări publicate în reviste științifice naționale și internaționale cu recenzenti:

1. **Anghel L.**, Balasoïu M., Ishchenko L., Stolyar S.V., Rogachev A., Kurkin T.S., Kuklin A.I., Raikher Yu., Iskhakov, R., Arzumanian G.M. SAXS studies of ultrasonicated dispersions of biomineral particles produced by *Klebsiella oxytoca*. Solid State Phenomena, vol. 190, 2012, pp. 621-624.

2. **Anghel L.**, Balasoiu M., Ishchenko L., Stolyar S.V., Kurkin T.S., Kuklin A.I., Kovalev Yu.S., Raikher Yu., Iskhakov, R., Duca Gh. Characterization of bio-synthesized nanoparticles produced by *Klebsiella oxytoca*. Journal of Physics: conference series, 2012, 351 (1) 012005.
3. **Anghel L.**, Duca Gh. A review of the biogenesis of iron nanoparticles using microorganisms and their applications. In: Chemistry Journal of Moldova, 2013, 8(2), p. 32-41.
4. **Anghel L.** Lactoferrin: analysis of the structure profile. In: Chemistry Journal of Moldova, 2014, 9(2), p. 99-106.
5. **Anghel L.** An investigation of the protonation states of human lactoferrin iron-binding protein. In: Chemistry Journal of Moldova, 2015, 10(1), p. 70-74.

Lucrări publicate în culegeri internaționale fără recenzanți:

1. Balasoiu M., **Anghel L.**, Rogachev A., Ishchenko L., Jigunov A., Arzumanian G., Stolyar S., Iskhakov R., Raikher Yu. Ultrasonic treatment effect on the long-term stability of biogenic ferrihydrite nanoparticles samples in aqueous solution under ambient conditions. FLNP Annual Report 2010, versiunea electronică (http://flnp.jinr.ru/img/529/1011_4-exp_rep_2010-site.pdf).
2. **Anghel L.**, Balasoiu M., Lazar D.M., Ishchenko, L. Stability of tris-1,10-phenantroline iron (II) complex in biomineral particles produced by *Klebsiella oxytoca*. JINR Communications, E14-2011-75, p. 1-8.

Teze ale comunicărilor științifice naționale și internaționale:

1. Balasoiu M., **Anghel L.**, Rogachev A., Ishchenko L., Jigunov A., Arzumanian G., Stolyar S., Iskhakov R., Raikher Yu. SANS and SAXS studies of biomineral particles produced by bacteria *Klebsiella oxytoca*. European Conference on Neutron Scattering, Praga, Czech Republic, 2011, p.306.
2. **Anghel L.**, Balasoiu M., Rogachev A., Kuklin A.I., Raikher Yu. Structural Investigations of Biogenic Ferrihydrite nanoparticles using ATLAS Program Molecular Calculations. International Conference Dubna-Nano 2012, JINR, Dubna Russian Federation, Abstract book. p. 20.
3. **Anghel L.**, Balasoiu M., Kovalev Yu.S., Ishchenko L. Biogenic ferrihydrite nanoparticles for biomedical applications. XXII СОВЕЩАНИЕ по использованию рассеяния нейтронов в исследованиях конденсированного состояния”, Gatchina, Russia, 2012, p. 148.
4. Koltovaya N., Balasoiu M., **Anghel L.**, Pontieri P., Hartings H., Alifano P., Del Giudice L. Yeast as a model system for Friedreich's ataxia: SANS and HRTEM study of both iron and tellurite nanoparticles in mitochondria. Book of Abstracts, 26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Germany, 2013, p. S198.
5. **Anghel L.**, Balasoiu M., Kovalev Yu.S., Ishchenko L., Stolyar S., Raikher, Yu. Complex investigation of Bacterial Ferrihydrite Nanoparticles Assembled on polysaccharide Template. International Conference on Magnetic Fluids CSIR-National Physical Laboratory, New Delhi, India, 2013, p. 251-252.
6. **Anghel, L.**, Erhan, R.V., Duca, Gh. A study of conformational dynamics of the human lactoferrin protein based on molecular dynamics simulations. International Conference dedicated to the 55th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry of the Academy of Science of Moldova, Chisinau, Republic of Moldova 2014, p. 51.

ADNOTARE

Anghel Lilia "Aspecte fizico-chimice ale procesului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor de fier", teză de doctor în științe chimice, Chișinău, 2016. Teza este constituită din compartimentul de introducere, patru capitole în care sunt prezentate noțiuni teoretice și contribuții proprii ce constau din rezultate obținute experimental și teoretic, concluzii generale și recomandări, bibliografie cu 232 titluri, 2 anexe, 114 pagini de text de bază, 22 tabele și 48 figuri. Rezultatele obținute sunt publicate în 12 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: nanoparticule de fier, mecanisme moleculare, biosorbție, *Dunaliella salina*, biomineralizare, lactoferina, simulări de dinamică moleculară.

Domeniul de studiu: 144.01. - Chimie fizică

Scopul tezei constă în studierea aspectelor fizico-chimice și mecanismului sintezei microbiologice a nanoparticulelor pe bază de fier.

Obiective: elaborarea unei metodologii de testare a microorganismelor pentru identificarea capacității de obținere a nanoparticulelor, la nivel de laborator; identificarea factorilor fizico-chimici ce favorizează procesul de sinteză microbiologică a nanoparticulelor; cercetarea unor proteine pentru stabilirea mecanismelor care stau la baza procedurii dirijate de sinteză a nanoparticulelor de fier.

Noutatea și originalitatea științifică. Pentru prima dată au fost stabilite mecanismele procesului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor de fier. Pentru prima dată a fost utilizată metoda de simulare de dinamică moleculară pentru cercetarea mecanismelor procesului de sinteză a nanoparticulelor de fier.

Problema științifică soluționată constă în identificarea mecanismelor ion-moleculare care stau la baza procedurii dirijate de sinteză a nanoparticulelor de fier cu utilizarea tulpinii de microalge verzi *Dunaliella salina* CNM-AV-02 fapt ce va permite optimizarea metodelor microbiologice existente.

Semnificația teoretică. Rezultatele obținute contribuie la consolidarea cunoștințelor despre mecanismele care stau la baza procesului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor de fier cu utilizarea microalgelor. De asemenea, a fost demonstrată posibilitatea utilizării metodelor de simulare de dinamică moleculară pentru explicarea fenomenelor fizico-chimice ce se petrec la nivel molecular.

Valoarea aplicativă a lucrării. Cercetările aplicative au permis elaborarea unei metode de evaluare a capacității microorganismelor de a sintetiza nanoparticule, dar și de optimizare a metodelor microbiologice existente pentru modificarea dirijată a parametrilor fizico-chimici ai nanoparticulelor de interes științific.

Implementarea rezultatelor științifice. Metoda de evaluare a microorganismelor pentru identificarea capacității de obținere a nanoparticulelor, la nivel de laborator, a fost testată în Laboratorul de Ficobiotehnologie, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie AȘM.

АННОТАЦИЯ

Ангел Лилия «Физико-химические аспекты процесса микробиологического синтеза наночастиц железа» диссертация доктора химических наук, Кишинев, 2016. Диссертация состоит из введения, четырех глав, в которых представлены теоретические и экспериментальные результаты, общие выводы и рекомендации, библиографии содержащей 232 названий, 2 приложений, 114 страниц основного текста, 22 таблиц и 48 рисунков. Полученные результаты опубликованы в 12 научных работах.

Ключевые слова: наночастицы железа, молекулярные механизмы, биосорбция, *Dunaliella salina*, биоминерализация, лактоферрин, расчеты молекулярной динамики.

Специальность: 144.01. – Физическая химия

Цель работы состоит в изучении физико-химических аспектов и механизмов микробиологического синтеза наночастиц железа.

Задачи: разработка методики тестирования микроорганизмов для выявления способности получения наночастиц, в лабораторных условиях; выявление физико-химических факторов влияющих на процесс микробиологического синтеза; исследование некоторых протеин участвующих в процессе микробиологического синтеза наночастиц железа.

Научная новизна и оригинальность: Впервые были выявлены механизмы процесса микробиологического синтеза наночастиц. Впервые был использован метод расчета молекулярной динамики для исследования механизмов процесса микробиологического синтеза наночастиц железа.

Решенная научная проблема состоит в выявлении основных ионно-молекулярных механизмов микробиологического синтеза наночастиц железа используя штам зеленой водоросли *Dunaliella salina* CNM-AV-02 что позволит оптимизировать существующие микробиологические методы синтеза.

Теоретическое значение. Полученные результаты способствуют расширению и углублению знаний о механизмах, лежащих в основе процесса микробиологического синтеза наночастиц с использованием микроводорослей. Также в работе было доказано возможность использования метода расчета молекулярной динамики для исследования физико-химических процессов, происходящих на молекулярном уровне.

Практическая значимость работы. Проведенные практические исследования позволили разработать методику оценки способности микроорганизмов синтезировать наночастицы, а также возможности оптимизации существующих микробиологических методов для улучшения физико-химических параметров наночастиц.

Использование результатов исследований. Метод оценки микроорганизмов для выявления способности синтезировать наночастицы, в лабораторных условиях, был испытан в Лаборатории Фитомикробиологии, Институт Микробиологии и Биотехнологии АНМ.

ANNOTATION

Anghel Lilia „Physico-chemical aspects of the process of microbiological synthesis of iron nanoparticles”, doctoral dissertation in Chemistry, Chisinau, 2016. Dissertation consists of an introduction compartment, four chapters containing theoretical concepts and personal contributions of experimental and theoretical results, general conclusions and recommendations, references with 232 titles, 2 appendixes, 114 pages of basic text, 22 tables and 48 figures. The obtained results were published in 12 scientific papers.

Keywords: iron nanoparticles, molecular mechanisms, biosorption, *Dunaliella salina*, biomineralization, lactoferrin, molecular dynamics simulations.

The field of study: 144.01. – Physical chemistry

The **goal** of the thesis consists in the study physicochemical aspects and mechanism of microbiological synthesis of iron nanoparticles.

Objectives: elaboration of a methodology for testing microorganisms for identification of their capability of nanoparticles synthesis, in laboratory conditions; identification of the physicochemical factors that favorize the process of microbiological synthesis of nanoparticles; study of some proteins for identification of the mechanisms of the microbiological synthesis of iron nanoparticles.

Originality and scientific novelty. For the first time were established the mechanisms of the microbiological synthesis of iron nanoparticles. For the first time, the molecular dynamics simulations method was used for the research of the mechanisms of the microbiological synthesis of iron nanoparticles.

Scientific problem solved consists of the identification of the ion-molecular mechanisms involved in the microbiological synthesis of iron nanoparticles using the strain of green microalgae *Dunaliella salina* CNM-AV-02, which will contribute to the optimization of the existing microbiological methods of synthesis.

Theoretical significance. The obtained results contribute to the strengthening the knowledge on the mechanisms involved in the microbiological synthesis of iron-based nanoparticles using microalgae. Moreover, it was proved the possibility of using the molecular dynamics simulation methods for the investigation of physicochemical processes on the molecular level.

Applicative value of the present work. The conducted applicative research allowed to develop a method of evaluation of capability of microorganisms to synthesize nanoparticles and optimization of the existing microbiological methods for the improvement of physicochemical parameters of nanoparticles.

Implementation of scientific results. The method of evaluation of capability of microorganisms to synthesize nanoparticles, in laboratory conditions, was tested in the Laboratory of Phycobiotechnology, The Institute of Microbiology and Biotechnology of ASM.

ANGHEL LILIA

**ASPECTE FIZICO-CHIMICE ALE PROCESULUI DE SINTEZĂ
MICROBIOLOGICĂ A NANOPARTICULELOR DE FIER**

144.01 – CHIMIE FIZICĂ

Autoreferatul tezei de doctor în științe chimice

Aprobat spre tipar: 06.06.2016.
Hîrtie ofset. Tipar ofset.
Coli de tipar.: 1,8.

Formatul hîrtiei 60x84 1/16.
Tiraj 80 ex.
Comanda nr. 69/16.

Centrul Editorial-Poligrafic al USM
str. Al. Mateevici, 60, Chișinău, MD 2009

www.usmcep@mail.ru