ACADEMIA DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI INSTITUTUL DE CHIMIE

Cu titlu de manuscris C.Z.U.: 544.165:546.72(043.2)

ANGHEL LILIA

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

144.01 – CHIMIE FIZICĂ

Teză de doctor în științe chimice

Conducător științific:

Duca Gheorghe, academician, doctor habilitat în științe chimice, profesor universitar

Autor:

Anghel Lilia

CHIȘINĂU, 2016

© Anghel Lilia, 2016

MULŢUMIRI

Adresez mulțumirile mele celor care m-au încurajat și mi-au oferit suport constant pentru realizarea acestei teze de doctor.

Mulțumesc în mod deosebit domnului Acad., Dr. hab. în științe chimice, prof. univ. Gheorghe Duca, profesorul meu îndrumător pentru toată susținerea și îndrumarea mea pe parcursul Școlii Doctorale.

De asemenea, mulțumesc colegului meu Dr. Raul Victor Erhan, pentru sprijinul și ajutorul acordat la efectuarea calculelor de simulare de dinamică moleculară și la propunerile pentru analiza experimentală utilizând împrăștierea de raze-X și neutroni.

Mulțumesc colegilor de la Institutul Unificat pentru Cercetări Nucleare, Dubna, Federația Rusă, care m-au susținut și mi-au oferit consultații științifice pe parcursul stagiului meu.

Mulțumesc colegilor de la Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei, în special doamnei Dr. Liliana Cepoi și doamnei Dr. Iulia Iațco pentru sprijin și sfaturi în elaborarea experimentelor cu utilizarea biomasei de microalge *Dunaliella salina*.

Adresez mulțumiri echipei de Small Angle X-ray Scattering de la EMBL-Hamburg pentru sfaturile pe care le-am primit pe parcursul evenimetului organizat EMBO Course 2012.

Această lucrare a fost posibilă prin sprijinul financiar oferit prin Programul de Colaborare IUCN-România, în cadrul proiectelor Nr.81/18.02.2013-37 și Nr.95/17.02.2014-26 din cadrul Temei IUCN Nr.04-4-1069-2009/2014.

În cele din urmă doresc să îmi exprim recunoștința și adresez mulțumirile mele părinților mei pentru susținerea și înțelegerea pe care mi-au acordat-o pe parcursul anilor de studii.

CUPRINS

ADNO	DTĂRI	6			
LIST	A ABREVIERILOR	9			
INTR	ODUCERE	10			
1.	SINTEZA MICROBIOLOGICĂ A NANOPARTICULELOR DE FIER	18			
1.1.	Nanoparticulele pe bază de fier și proprietățile acestora	18			
1.2.	Aplicații ale nanoparticulelor pe bază de fier	19			
1.3.	Considerații generale ale sintezei nanoparticulelor pe bază de fier				
1.4.	Aspectele fizico-chimice ale mecanismului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor de fier	26			
1.4.1.	Biosorptia	28			
1.4.2.	Biomineralizarea	33			
1.5.	Concluzii la capitolul 1	37			
2.	ASPECTELE FIZICO-CHIMICE ALE SINTEZEI MICROBIOLOGICE A				
	NANOPARTICULELOR DE FIER	39			
2.1.	Tulpina <i>Dunaliella salina</i> ca model de studiu	40			
2.2.	Metodologia studiului de sorbție microbiologică a ionilor de fier de către celulele				
	tulpinii Dunaliellei salina	42			
2.3.	Efectul parametrilor de operare asupra procesului de sorbție microbiologică a				
	ionilor de fier	48			
2.4.	Descrierea procesului de sorbție microbiologică a ionilor de fier	57			
2.5.	Analiza spectrală a biomasei Dunaliella salina în domeniul IR	62			
2.6.	Concluzii la capitolul 2	64			
3.	STUDII FIZICO-CHIMICE ALE PROTEINELOR IMPLICATE ÎN				
	PROCESUL DE SINTEZĂ MICROBIOLOGICĂ	66			
3.1.	Transferinele	66			
3.2.	Lactoferina	68			
3.3.	Metodologia de cercetare a structurii și mecanismului de interacțiune a lactoferinei				
	cu ionii de Fe(III)	70			
3.4.	Studiu de aliniere multiplă a moleculelor de lactoferină	74			
3.5.	Validarea fișierului de structură al lactoferinei diferice umane	78			
3.6.	Studiul constantelor de aciditate ale resturilor de aminoacizi din structura				
	lactoferinei umane	82			

3.7.	Calculul potențialului electrostatic pe suprafață	84
3.8.	Caracterizarea spectrală a lactoferinei umane în domeniul IR	86
3.9.	Concluzii la capitolul 3	90
4.	SIMULĂRI DE DINAMICĂ MOLECULARĂ	91
4.1.	Bazele teoretice ale simulărilor de dinamică moleculară	91
4.2.	Procedura simulării de dinamică moleculară	94
4.3.	Simularea de dinamică moleculară a lactoferinei	95
4.4.	Evaluarea calității experimentelor de dinamică moleculară	98
4.5.	Evaluarea stabilității lactoferinei în diferite conformații	101
4.6.	Evaluarea rolului unor resturi de aminoacizi din structura proteică	107
4.7.	Concluzii la capitolul 4	111
CON	CLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	113
BIBL	IOGRAFIE	115
ANEX	κε	131
Anexa	1. Act de implementare	132
Anexa	2. Diplome, certificate de participare	133
DECI	ARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	138
CV-u	AUTORULUI	139

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 capabilității 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 procedeului dirijat 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 procedeului dirijat 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 capabilității 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 capabilității 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 оснокного 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 механизм микробиологического синтеза наночастиц железа.

Задачи: разработка методики тестирования микроорганизмов для выявления способности получения наночастиц, в лабораторных условиях; выявление физикохимических 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 ионномолекулярных 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.

7

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.

LISTA ABREVIERILOR

HEPES	acid N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etan sulfonic)
DTT	ditiotretiol
SAXS	împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X
PDB	baza de date pentru proteine
RMSD	devierea medie pătratică
RMSF	fluctuațiile medii pătratice
SASA	aria suprafeței accesibilă solventului

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța problemei abordate. Nanotehnologia este un termen general utilizat pentru a defini tehnologiile moderne elaborate pentru fabricarea dispozitivelor de dimensiuni nanometrice, capabile să manipuleze materia la nivel atomic și molecular [1]. În ultimele decenii domeniul nanotehnologiilor s-a impus ca un domeniu de mare actualitate cu un impact revoluționar industrial și social. Acest fapt este confirmat de existența programelor de cercetare internaționale în domeniul nanotehnologiilor precum Inițiativa Națională în Nanotehnologie (SUA) [2] și Programul Cadru 7 sau Orizont 2020 (Uniunea Europeană) [3], în care se pune accent pe dezvoltarea nanotehnologiilor și aplicațiile acestora. Nanomaterialele cu proprietăți magnetice oferă multe avantaje. Datorită proprietăților structurale și magnetice unice care se manifestă la scară nanometrică, nanoparticulele magnetice au devenit elemente cheie în diferite domenii precum fabricație, mediu, energie și sănătate [4]. O categorie de nanoparticule de interes major reprezintă nanoparticulele pe bază de fier. 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, o atenție deosebită a fost acordată elaborării procedeelor de sinteză a nanoparticulelor pe bază de fier [5].

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 [6, 7]. 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 [8]. Cele mai utilizate tehnici fizice sau chimice utilizate pentru sinteza nanoparticulelor pe bază de fier includ condensarea [9], nanodispersarea [10], descompunerea termică [11], reducerea chimică [12], sinteza în micele inverse [13] și co-precipitarea [14]. 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 [15-18]. 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. Compoziția chimică și proprietățile de suprafață ale acestor nanoparticule sunt adaptate astfel încât să răspundă forțelor biochimice și biomecanice, reacțiilor celulare sau tesuturilor vii [19]. 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 [20-24]. La nivel național au fost inițiate cercetări legate de obținerea nanoparticulelor de argint cu utilizarea tulpinii de microalge verzi-albăstrii *Spirulina platensis* [25, 26]. 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. Studierea 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 capabilității 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 procedeului de sinteză dirijată a nanoparticulelor de fier.

Noutatea și originalitatea științifică. Pentru prima dată a fost elaborată metodologia de evaluare a capabilității 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 mecanismele ion-moleculare ale procesului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor pe bază de fier prin metode fizicochimice și simulări de dinamică moleculară.

Problema științifică soluționată constă în identificarea mecanismelor ion-moleculare care stau la baza procedeului dirijat 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 au permis elaborarea unei metode de evaluare a capabilității 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.

Baza metodologică a cercetărilor științifice descrisă în prezenta teză de doctorat include o serie de metode de cercetare și caracterizare structurală a macromoleculelor organice, precum *grafica moleculară*, metoda de *aliniere multiplă* a secvențelor cu pachetul de programe *Visual Molecular Dynamics*, calculele constantelor de aciditate ale resturilor de aminoacizi din structura proteică prin aplicarea modelului electrostatic continuu Poisson-Boltzmann, calculele potențialului electrostatic pe suprafață realizate cu pachetul de programe APBS, metoda de împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X, spectroscopia UV-VIS și FTIR. Experimentele de simulare de dinamică moleculară au fost realizate cu pachetul de programe GROMACS v4.5. Acest pachet de programe rulează în mediul de operare Linux. Fișierele ce conțin coordonatele inițiale ale structurii proteice au fost preluate din Banca de Date pentru Proteine.

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 procedeului de evaluare a procesului de sorbție microbiologică, fiind recomandat ca un protocol de cercetare pentru testarea microorganismelor, cu scopul de a identifica capabilitatea 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 capabilității de obținere a nanoparticulelor, la nivel de laborator, a fost testată în Laboratorul de Ficobiotehnologie, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie AŞM (Anexa 1).

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.

În cadrul conferinței "2nd European Nuclear Physics Conference", 17-21 Septembrie 2012, București, România, rezultatele prezentate au fost apreciate cu diplomă pentru cea mai bună prezentare poster în domeniul Aplicații ale Fizicii Nucleare.

Consiliul Științific al Laboratorului de Fizică a Neutronului "I.M. Frank" din cadrul Institutului Unificat pentru Cercetări Nucleare, Dubna, Federația Rusă a oferit diploma pentru seria de lucrări efectuate la tema "Biogenic nanoparticles produced by *Klebsiella oxytoca* for medical applications structure and properties investigations" (vezi Anexa 2).

Consiliului Științific al Institutului Unificat pentru Cercetări Nucleare, Dubna, Federația Rusă a oferit premiul de încurajare în domeniul Cercetărilor în Fizică Experimentală pentru anul 2014 pentru direcția de cercetare "Structure and Properties of Magnetic Nanoparticles Produced by Bacteria *Klebsiella oxytoca*: comprehensive research and experimental validation of biomedical applications" (vezi Anexa 2).

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

- "Molecular dynamics simulations and experimental studies of diferric human lactoferrin", Departamentul de Fizică Nucleară, IFIN-HH, Magurele, București, România, 13.12.2012;
- "Molecular Dynamics simulations of human lactoferrin: Insights into the mechanism of iron binding", Departamentul de Fizică Nucleară, IFIN-HH, Magurele, București, România, 24.04.2013;
- "Molecular Dynamics simulations of the mechanism of iron binding to lactoferrin", Institutul de Chimie al Academiei de Științe a Moldovei, Chişinău, 03.06.2013.

Sumarul compartimentelor tezei. Lucrarea 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.

În capitolul 1 **"Sinteza microbiologică a nanoparticulelor de fier"** se prezintă partea teoretică a lucrării ce vizează prezentarea și analiza stadiului actual al cunoașterii în domeniul sintezei microbiologice a nanoparticulelor pe bază de fier. În prima parte a acestui capitol, în rând cu introducerea generală, se prezintă o scurtă introducere în subiectul sintezei nanoparticulelor. De asemenea, este introdusă o scurtă discuție privind metoda microbiologică, cu accent pe aspectele fizico-chimice ale mecanismelor, care stau la baza acestei metode. Se subliniază importanța studierii mecanismelor ion-moleculare implicate în metoda microbiologică de sinteză a nanoparticulelor.

În capitolul 2 "Aspectele fizico-chimice ale sintezei microbiologice a nanoparticulelor de fier" se prezintă metoda de evaluare a capabilității microorganismelor de a sintetiza nanoparticule metalice cu utilizarea tulpinii *Dunaliella salina CNM-AV-02*.

Microalga verde *Dunaliella salina* are o selectivitate sporită a sistemului de transport pentru ionii de Fe(III), caracterizat de un proces neobișnuit de acumulare a ionilor de fier din mediu ce constă din: (I) etapa de legare a fierului din mediu, care ar putea fi atribuită proceselor de biosorbție la suprafața celulară; (II) etapa de de transportare a fierului în interiorul celulei, ce se datorează proceselor metabolice din etapa de acumulare. Ambele etape se realizează cu participarea unei proteine, identificată ca membru al familiei de transferine. Specificitatea procesului de legare a fierului constă în producerea acestei proteine, de tip transferină, care este un fenomen deosebit, întrucât în literatura de specialitate nu există indicații anterioare despre plante sau alte specii de alge care să producă acest tip de proteine. Astfel, celulele microalgei verzi *Dunaliellei salina* au fost selectate pentru studierea factorilor esențiali și identificarea condițiilor optime pentru desfășurarea procesului de acumulare a ionilor de fier și formare a nanoparticulelor. Au fost cercetați factorii ce influențează performanța sorbției microbiologice a *Dunaliellei*. În acest sens a fost urmărit procesul de sorbție microbiologică a ionilor de fier din mediul extracelular în funcție de factorii operaționali responsabili de realizarea procesului de sorbție microbiologică: timpul de contact; cantitatea de biomasa utilizată; pH-ul inițial al soluției; concentrația inițială a ionilor de fier în mediu; prezența ionilor de fier în mediul de cultivare a celulelor; prezența altor specii în mediu; efectul salinității mediului de cultivare.

Procesul de sorbție microbiologică a ionilor de fier, cercetat în cadrul studiului a fost descris prin modelele izotermelor de adsorbție Langmuir, Freundlich și Dubinin-Radushkevich. S-a stabilit că sorbția ionilor de fier de către celulele vii ale *Dunaliellei salina* este bine descrisă de modelul izotermei Freundlich.

În plus, biomasa *Dunaliellei salina* a fost cercetată prin spectroscopia FTIR, iar rezultatele acestei analize au permis identificarea reacțiilor care stau la baza procesului de adsorbție a ionilor de fier, acestea fiind reacțiile de schimb ionic și complexare cu participarea unor structuri moleculare de tip proteine.

În capitolul 3 **"Studii fizico-chimice ale proteinelor implicate în procesul de sinteză microbiologică"** se prezintă rezultatele cercetărilor legate de structura și mecanismul de interacțiune a moleculei proteice de lactoferină cu ionii de fier prin aplicarea tehnicilor computaționale și experimentale.

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. Microorganismele sintetizează cantități mari de proteine responsabile de reducerea ionilor metalici și legarea acestora în mediul extracelular. Studierea mecanismului interacțiunii structurilor proteice cu ionii de fier contribuie la înțelegerea și optimizarea procesului de sinteză microbilogică a nanoparticulelor de fier. Pentru realizarea obiectivelor propuse în capitolul 3 a fost selectată molecula de lactoferină.

Lactoferina posedă numeroase funcții biologice. Proprietățile biochimice ale lactoferinei derivă din caracteristicile structurale ale acesteia precum și din funcția de bază de legare a ionilor de fier. Din 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 microbilogică a nanoparticulelor de fier, dar și la elaborarea unor metodologii pentru aplicații biotehnologice în medicină.

În capitolul 3, a fost elaborat un protocol de cercetare pentru studierea structurilor moleculare biologice care combină o serie de metode de cercetare și caracterizare structurală a

lactoferinei. Au fost utilizate fișiere de structură preluate din Banca 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 împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X.

Prin metoda de calcul a constantelor de aciditate ale resturilor de aminoacizi din structura proteinei, s-a arătat că procesul de legare sau eliberare a ionilor de Fe(III) de pe centrii activi ai proteinei este influențat de starea de protonare a aminoacizilor din sfera de coordinare primară, dar și de arginina din poziția 121 și 210, și lizina din poziția 301 din sfera de coordinare secundară a secvenței proteice.

Prin metoda de calcul al potențialului electrostatic pe suprafață, a fost stabilită dependența procesului de modificare a conformației lactoferinei de valoarea pH-ului mediului. S-a arătat că, micșorarea pH-ului mediului conduce la modificarea potențialului electrostatic pe suprafață, iar odată cu micșorarea pH-ului mediului fiziologic crește sarcina pozitivă a proteinei. Extinderea regiunilor de sarcină pozitivă pe suprafața proteinei va crea respingerea electrostatică între resturile aminoacizilor, inclusiv și a celor din centrii activi ai proteinei, rezultând în deschiderea lobului și eliberarea ionului de fier.

În capitolul 4 **"Simulări de dinamică moleculară"**, au fost studiate aspectele mecanismului de sinteză a nanoparticulelor pe baza de fier cu participarea microorganismelor prin tehnica de modelare de dinamică moleculară. Această metodă de studiu a fost aplicată pe familia de proteine, transferine, ce sunt responsabile de legarea ionilor de fier din mediul celular și transportarea acestora în interiorul celulei microorganismului. Pentru aceste studii, a fost selectată molecula proteică de lactoferină.

Cercetările realizate în cadrul acestei etape au fost orientate în două direcții și anume: studierea stabilității lactoferinei în diferite conformații, iar pe de altă parte, evaluarea rolului unor resturi de aminoacizi din structura proteică din apropierea sferei de coordinare a ionilor metalului din centrul activ al lactoferinei.

În cadrul capitolului 4, a fost elaborat un protocol de cercetare pentru studierea structurilor moleculare biologice, care combină o serie de metode de cercetare și caracterizare structurală, pregărtirea configurației de pornire și crearea sistemului molecular pentru simulare, realizarea experimentelor de simulare de dinamică moleculară și interpretarea rezultatelor obținute.

Astfel, prin metoda de simulare de dinamică moleculară, a fost stabilită importanța participării ionilor de carbonat în stabilizarea centrilor activi pe care se leagă ionii de fier.

Eliberarea ionilor de carbonat din structura proteinei induce tranziția structurală de la conformația închisă spre conformația deschisă a moleculei de lactoferină.

Utilizând metoda de simulare de dinamică moleculară, s-a stabilit 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.

Cercetările realizate în cadrul acestei teze de doctorat au fost efectuate în centrele de cercetare naționale și internaționale precum Institutul de Chimie al Academiei de Științe a Moldovei, Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei, Institutul Unificat pentru Cercetări Nucleare, Dubna, Federația Rusă, DESY (Deutsches Elektronen-Synchrotron) din Hamburg, Germania, Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizică și Inginerie Nucleară Horia Hulubei, Magurele, București, România.

1. SINTEZA MICROBIOLOGICĂ A NANOPARTICULELOR DE FIER

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 scara 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. Materialele de dimensiuni nanometrice prezintă interes atât pentru cercetările fundamentale cât și pentru cele cu caracter aplicativ. Acest interes se datorează fenomenelor și proprietăților interesante și uneori neașteptate, care apar la materialele de dimensiuni nanometrice. Aceleași materiale la scală nanometrică vor avea o arie a suprafeței mai mare, prin urmare reactivitatea lor va fi sporită. De asemenea, la scală nanometrică domină efectele cuantice care influențează proprietățile optice, magnetice, electrice sau dielectrice ale materialelor [7].

1.1. Nanoparticulele pe bază de fier și proprietățile acestora

De-a lungul ultimilor ani, nanoparticulele pe bază de fier au constituit 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. Este necesar de menționat că aceste nanoparticule, cu o suprafață de acoperire de o compoziție chimică corespunzătoare, sunt un instrument eficient pentru numeroase aplicații medicale precum intensificarea contrastului în domeniul de imagistică prin rezonanța magnetică cu agenți de contrast, tratarea țesuturilor, teste imunologice, detoxificarea fluidelor biologice, tratamentul cancerului prin hipertermie, transportul medicamentelor [27-29].

Proprietățile fizice și chimice ale particulelor la scală nanometrică sunt influențate de forma și dimensiunea acestora [30]. Prin urmare, proprietățile acestora pot fi manipulate prin varierea mărimii lor și prin adaptarea suprafeței de acoperire.

Dimensiunea particulelor pe bază de fier constituie un factor decisiv în definirea proprietăților magnetice. S-a observat că în cazul structurilor de dimensiuni nanometrice la temperaturi suficient de ridicate apare un răspuns superparamagnetic. Astfel, datorită dimensiunilor nanometrice, particulele de magnetită (Fe₃O₄) în fluid au o valoare a temperaturii Curie de 850 K, iar polarizarea aproape completă a spinului are loc la temperatura camerei, ambele proprietăți având un potențial mare de aplicare în producerea nano-dispozitivelor de tip valvă de spin cu magnetorezistență gigantică [31].

O categorie aparte a nanotehnologiei o constituie ferofluidele, ce prezintă simultan proprietățile unui lichid cât și proprietăți magnetice ca ale unui solid. Acestea sunt constituite din nanoparticule coloidale cu proprietăți magnetice suspendate într-un solvent. Ferofluidele constau din particule pe baza de fier, iar proprietățile acestora sunt influențate de dimensiunea particulelor, de gradul de dispersare omogenă al acestora în mediul lichid dar și de surfactantul utilizat pentru dispersarea acestora [32].

Nanoparticulele pe bază de oxizi de fier, precum maghemita γ -Fe₂O₃, magnetita Fe₃O₄ și hematitul α -Fe₂O₃ au fost intens studiate pentru potențiale aplicații în domeniul ingineriei medicale. Una dintre cerințele de bază ale aplicațiilor bio-medicale este dimensiunea nanometrică a particulelor. Această cerință este justificată de faptul că dimensiunea nanometrică este caracteristică moleculelor biologice și sistemelor celulare. În acest context, particulele de dimensiuni nanometrice sunt candidații ideali pentru aplicații *in vivo* și *in vitro* în cercetarea biomedicală [33]. De asemenea, pentru realizarea aplicațiilor bio-medicale este esențial controlul toxicității și biocompatibilitatea nanoparticulelor. Studiile realizate pentru evaluarea citotoxicității nanoparticulelor de fier au arătat că acestea nu induc alterări ale permeabilității membranare și prezintă un nivel scăzut de citotoxicitate *in vivo* și *in vitro* [34]. Citotoxicitatea identificată se datorează reagenților chimici utilizați în procesul de sinteză al nanopaticulelor. Prin urmare, un factor important ce influențează aplicațiile nanoparticulelor este însăși metoda de sinteză a acestora.

1.2. Aplicații ale nanoparticulelor pe bază de fier

Interesul crescut pentru domeniul cercetărilor axate pe nanomateriale a condus la dezvoltarea rapidă a aplicațiilor în domeniul nanotehnologiilor. În momentul de față, nanoparticulele pe bază de fier sunt implementate cu succes în domenii precum fabricație, mediu, energie și sănătate. În continuare vor fi evidențiate doar câteva aplicații ale nanoparticulelor pe bază de fier care au fost raportate în literatura de specialitate.

Aplicații industriale

Nanoparticulele pe bază de fier au căpătat un mare interes pentru aplicațiile industriale datorită proprietăților intrinseci ale componentelor acestora precum și a efectelor de dimensiune și de suprafață. La scală nanometrică, particulele pe bază de fier manifestă proprietăți superparamagnetice. De asemenea, acestea au o puternică tendință de aglomerare care poate fi înlăturată prin tratarea particulelor cu agenți de acoperire. Fiecare aplicație potențială a acestor nanoparticule necesită diferite proprietăți și diferiți agenți de acoperire. De exemplu, în domeniul

dispozitivelor de înregistrare, proprietățile feromagnetice și antiferomagnetice ale componentelor nanostructurale influențează capacitatea de înregistrare a dispozitivelor [35, 36]. Un alt exemplu de posibile aplicații industriale ale nanoparticulelor pe bază de fier este utilizarea acestora în calitate de catalizatori de tip Fenton pentru fotodegradarea poluanților organici [37, 38].

Catalizatorii pe bază de oxizi ai fierului precum magnetita și hematitul au o întrebuințare largă în producerea industrială, precum sinteza NH_3 (procesul Haber), desulfurizarea gazului natural, dehidrogenarea etilbenzenului și obținerea stirenului, sinteza Fischer-Tropsh a hidrocarburilor, oxidarea alcoolilor și producerea la scară largă a butadienei [39].

Aplicații medicale

În practica curentă, nanoparticulele pe bază de fier trebuie să îndeplinească următoarele cerințe pentru aplicațiile medicale:

- să nu inducă toxicitate;
- să nu modifice pH-ul sângelui;
- să posede o rezistență bună la acțiunea degradantă a fluidelor biologice;
- să nu declanșeze fenomene de respingere din partea organismului;
- să nu se acumuleze în țesuturi.

În acest sens, nanoparticulele pe bază de fier trebuie tratate astfel încât acestea să fie biocompatibile cu organismul viu, stabile și să aibă o bună dispersie în surfactant. Nanoparticulele pe bază de fier sunt atractive pentru aplicațiile bio-medicale. Aceste aplicații includ terapia cancerului, hipertermia, transportul medicamentelor, analiza ADN-ului, agenți antibacterieni, biosensori, agenți de contrast în imagistică prin rezonanța magnetică [40].

Hipertermia este o metodă de tratare a cancerului care în combinație cu chimioterapia reprezintă o alternativă eficientă în tratamentul unor forme de cancer. Distrugerea celulelor canceroase prin aplicarea tratamentelor clasice precum chimioterapia și radioterapia duce la deteriorarea celulelor sănătoase. În acest sens, hipertermia a primit o atenție deosebită din partea cercetătorilor întrucât conceptul care stă la baza acestui tratament constă în aplicarea locală a tratamentului termic în zona afectată de celulele canceroase. Pentru a obține o eficiență maximă, în tratamentul prin hipertermie se utilizează agenți hipertermici precum nanoparticule pe bază de fier, care sunt injectate în zona afectată. Nanoparticulele pe bază de oxizi de fier sunt utilizate în hipertermie, deoarece oxizii de fier sunt mediatori de căldură eficienți și în același timp transportori de medicamente [41, 42]. În prezent, magnetita este utilizată pe scară largă ca agent hipertermic. Particulele magnetice localizate în zona tumorii induc efectul de căldură sub influența unui câmp magnetic alternativ drept consecință are loc creșterea temperaturii locale

până la 40 - 50 °C. Astfel, celule canceroase sunt distruse fără a cauza un prejudiciu suplimentar țesuturilor sănătoase. Metoda este considerată a fi eficientă, deoarece s-a identificat că celulele canceroase sunt mai senzitive la temperatură decât celulele sănătoase [43, 44].

Sistemele de transportare a medicamentelor au fost dezvoltate pentru a permite pătrunderea medicamentelor până la țesutul țintă și preconcentrarea acestora în zona de interes, astfel diminuând efectele secundare al medicamentelor. Nano-transportorii țintă trebuie să navigheze prin barierele țesuturilor vii pentru a ajunge la celule. Particulele transportoare de medicamente trebuie să fie de dimensiuni mici, astfel încât acestea să poată trece de bariera hematoencefalică și joncțiunea țesutului epitelial, care în mod normal împiedică livrarea medicamentelor la țesutul țintă. Sistemele magnetice utilizate în transportul medicamentelor sunt direcționate către țesutul țintă prin aplicarea unui gradient de câmp magnetic. Majoritatea studiilor axate pe dezvoltarea medicamentelor cu transportare la țintă utilizează în calitate de transportori oxizi ai fierului precum magnetita și maghemita, întrucât fierul are proprietăți toxice scăzute [45]. Astfel, eficacitatea acestor sisteme va depinde de anumiți parametri precum proprietățile structurale și morfologice ale nanoparticulelor utilizate, concentrația acestora, modalitatea de administrare, intensitatea câmpului magnetic și.a.

Nanoparticulele pe bază de fier funcționalizate au fost implementate cu succes în diagnosticare, datorită posibilității de a le ghida folosind un câmp magnetic extern [46, 47]. Imagistica prin rezonanță magnetică este o tehnică a imagisticii medicale utilizată cu succes pentru identificarea și vizualizarea detaliată a structurii interne și funcțiilor corpului uman. Această metodă folosește fenomenul de rezonanță magnetică nucleară pentru obținerea imaginilor medicale. Câmpul magnetic rotativ produs de către atomii de hidrogen din corpul uman sub influența unui câmp magnetic puternic este detectat de către instalația de măsurare. Semnalul înregistrat este recepționat de calculator și convertit într-o imagine bi- sau tridimensională. Pentru a obține un contrast între celulele sănătoase și cele afectate de cancer, această tehnică necesită agenți de contrast [48]. În prezent, tehnica de imagistică prin rezonanță magnetică este limitată de proprietățile nanoparticulelor de fier. Astfel, îmbunătățirea proprietăților morfologice, structurale, chimice și prin urmare și magnetice ale nanoparticulelor de fier va contribui la îmbunătățirea contrastului în semnalul recepționat.

1.3. Considerații generale ale sintezei nanoparticulelor pe bază de fier

Metoda de sinteză este o componentă importantă în stabilirea domeniului de aplicabilitate a nanoparticulelor. Astfel, au fost elaborate și descrise în literatura științifică numeroase metode de sinteză a nanoparticulelor [49]. În general, acestea pot fi clasificate în metode fizice, chimice și biologice. De asemenea, metodele de sinteză a nanoparticulelor pot fi clasificate în *top-down* – de la *"mare*" la *"mic*" (nano) și *bottom up* sau auto-asamblarea, de la *"mic*" (atomi, molecule) la *"mare*". Metodele de tip *top-down* reprezintă metodele fizice în care se utilizează procedee de mărunțire a sistemelor mari pentru a obține sisteme de dimensiuni nanometrice. De cele mai multe ori, nanoparticulele obținute prin aceste metode au suprafețe și dimensiuni neomogene. Metodele de tip *bottom up* reprezintă totalitatea metodelor care au la bază procesele de auto-asamblare sau nucleație, în care participă atomii sau moleculele pentru obținerea sistemelor de dimensiuni nanometrice. În această categorie sunt incluse metodele chimice și biologice [30].

Numărul mare de aplicații ale nanoparticulelor determină cercetătorii să elaboreze noi metode de obținere ale acestora. La întocmirea noilor metode de sinteză a nanoparticulelor trebuie să se țină cont de următoarele cerințe:

- complexitatea structurală a particulelor de dimeniuni nanometrice, biocompatibilitatea;
- posibilitatea de a obține nanoparticule de forme și dimensiuni specifice;
- metoda trebuie sa fie simplă și să fie reproductibilă.

În practică este destul de dificil de elaborat o metodă care să întrunească toate aceste cerințe de aceea atenția cercetătorilor este continuu îndreptată spre găsirea de noi metode.

Metode fizice

În ultimele decenii au fost dezvoltate mai multe metode fizice pentru obținerea nanoparticulelor, cum ar fi metodele de condensare și nano-dispersarea. Aceste două categorii de metode fizice sunt cel mai frecvent utilizate în practica curentă.

Principiul care stă la baza metodelor de condensare constă în auto-asamblarea atomilor și moleculelor cu anumite proprietăți în faza de vapori și formarea nanoparticulelor de structură și dimensiunea dorită. Printre aceste metode se numără: sinteza în plasmă [50], ablația cu laser pulsat [51], sinteza în arc electric [52]. Aceste tehnici sunt reproductibile, iar nanostructurile rezultate sunt de puritate înaltă. Aplicabilitatea acestor metode este limitată de echipamentele complicate și costisitoare care sunt utilizate în proces.

O altă categorie de metode fizice de obținere a nanostructurilor este nano-dispersarea. În cadrul acestei categorii de tehnici de sinteză se detașează sinteza mecano-chimică. Această metodă constă în utilizarea energiei mecanice pentru intensificarea reacției chimice. Nanoparticulele obținute prin această metodă au un grad de dispersie redus [53]. Din această categorie poate fi menționată o altă metodă de obținere a nanostructurilor, și anume eroziunea electrolitică a aliajelor. În acest caz, produșii de reacție din lichidul dielectric acoperă suprafața

particulelor de dimensiuni nanometrice. Dimensiunea medie a particulelor rezultate este invers proporțională cu intensitatea curentului electric [54].

Metode chimice

Metodele chimice au fost implementate cu succes pentru obținerea nanoparticulelor. Acestea constau în utilizarea moleculelor de surfactant precum micele, polimeri sau alți agenți de acoperire pentru a controla distribuția dimensiunii particulelor sintetizate [55, 56]. Printre cele mai utilizate tehnici de sinteză chimică a nanoparticulelor se numără: descompunerea termică, reducerea chimică, sinteza în micele inverse, sinteza la interfața gaz-lichid.

Termoliza compuşilor pe bază de metal conduce la formarea nanoparticulelor. Particulele rezultate sunt stabilizate atunci când reacția se petrece în mediul lichid în care se conțin molecule de surfactanți sau polimeri [57, 58]. Aceasta metodă este atractivă datorită utilizării surfactanților și a polimerilor solubili în calitate de agenți de acoperire, ce asigură obținerea nanoparticulelor monodisperse cu un grad de puritate înalt.

Reducerea chimică are la bază utilizarea agenților reducători ce interacționează activ cu sărurile metalelor rezultând în formarea nanoparticulelor. Această metodă depinde de proprietățile chimice ale agenților reducători și necesită utilizarea agenților de acoperire pentru a controla dimensiunea particulelor rezultate. Reacțiile chimice se petrec în soluții apoase sau solvenți organici [59].

Sinteza nanoparticulelor în micele inverse are la bază procesele de nucleație și creștere a particulelor, ce decurg în interiorul micelelor. Micelele inverse sunt picăturile mici de apă stabilizate într-un solvent hidrofob, iar formarea nanoparticulelor are loc în interiorul acestor picături de apă. Această metodă oferă posibilitatea de a controla dimensiunea medie a particulelor și monodispersia lor, cunoscând cantitatea exactă de metal în fiecare micelă [60].

Nanoparticulele pot fi sintetizate la interfața gaz-lichid. În cadrul acestui procedeu are loc descompunerea compușilor metalelor și formarea unor specii active ce inițiază procesul de nucleație, rezultând în formarea nanoparticulelor de dimensiunea dorită. Deși metoda oferă posibilitatea de a controla dimensiunea particulelor, cinetica procesului este influențată de compoziția chimică a sărurilor metalelor și de faza lichidă și gazoasă a sistemului de reacție [61].

Metode biologice

În prezent există un interes continuu îndreptat spre dezvoltarea noilor metode de sinteză a nanoparticulelor, justificat de aplicațiile numeroase ale acestora, raportate în literatura de specialitate. O altă categorie de metode de sinteză a nanoparticulelor este cea biologică.

Procedeul implică utilizarea enzimelor microbiene, agenților fitochimici cu proprietăți oxidante sau reducătoare, sau utilizarea directă a microorganismelor pentru sinteza nanoparticulelor. Implementarea acestui set de metode oferă posibilitatea de a obține nanoparticule ale căror proprietăți sunt compatibile cu proprietățile biochimice ale mediului celular. Compoziția chimică și proprietățile de suprafață ale acestor nanoparticule sunt adaptate astfel încât să răspundă forțelor biochimice și biomecanice, reacțiilor celulare sau țesuturilor vii. Astfel, în cadrul acestei categorii de tehnici de sinteză se detașează metoda microbiologică, care implică utilizarea microorganismelor pentru obținerea particulelor metalice de dimensiuni nanometrice.

Celulele microorganismelor, intacte sau tratate în prealabil, fiind dispersate în soluțiile sărurilor unor metale, în condiții normale de temperatură și presiune, sintetizează particule de dimensiuni nanometrice. În Figura 1.1 este prezentată schema bloc a procedeului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor metalice.



Fig. 1.1. Schema bloc a procedeului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor metalice [62].

În funcție de locul în care se formează nanoparticulele, sinteza microbiologică poate fi clasificată în sinteză intracelulară [63] și extracelulară [64]. Literatura de specialitate abundă de

dovezi experimentale ce demonstrează capabilitatea mai multor organisme, atât unicelulare cât și pluricelulare, de a sintetiza materiale anorganice de dimensiuni nanometrice, fie intracelular sau extracelular. Microorganismele propuse pentru sinteza microbiologică intracelulară sau extracelulară a nanoparticulelor de fier sunt prezentate în Tabelul 1.1.

Tulpina	Nanoparticule	Dimensiunea	Forma	Locația	Ref.
Bacteria magnetotactică	magnetită,	32 – 43 nm	cub	intracelular	[66]
Bacteria magnetotactică	greigit	32 – 43 nm	cub	intracelular	[66]
Saccharomyces cerevisiae	fosfatul de fier	50 – 200 nm	sferă	extracelular	[67]
HSMV-1	magnetită	< 45 nm	alungită	intracelular	[68]
Sargassum muticum	magnetită	$18\pm 4 \ nm$	cub	extracelular	[69]
BoFeN1 Acidovorax sp.	fosfatul de fier	$100\pm25~\text{nm}$	sferă	extracelular	[70]
BoFeN1 Acidovorax sp	fosfatul de fier	40 nm	sferă	intracelular	[70]
Shewanella oneidensis	magnetită	40 - 50 nm	cub	extracelular	[71]
Shewanella putrefaciens	magnetită /	30 – 50 nm	alungită	intracelular	[72]
	maghemit				
Dechlorosoma suillum	magnetită	_	_	intracelular	[73]
Actinobacter sp.	magnetită	1 - 40 nm	sferă	_	[74]
Desulfovibrio magneticus	magnetită	40 nm	alungită	intracelular	[75]
Desulfovibrio magneticus	hematită	5 – 10 nm	alungită	extracelular	[75]
QH-2	magnetită	$58\pm20\ nm$	_	intracelular	[76]
Aspergellius fumigates	magnetită	42,40 nm	pulbere	_	[77]
Chaetomium globusum	magnetită	25,30 nm	pulbere	-	[77]
Curvularia lunata	magnetită	20,80 nm	pulbere	_	[77]
Aspergillius wentii	magnetită	46,50 nm	pulbere	_	[77]
Alcaligenes faecalis	sulfat de fier	43,60 nm	pulbere	_	[77]
Alcaligenes faecalis	magnetită	12,30 nm	pulbere	_	[77]
Bacillius coagulans	sulfat de fier	_	pulbere	_	[77]
Fussarium oxysporum	magnetită	20 – 50 nm	sferă	extracelular	[78]
Verticillium sp.	magnetită	10 - 40 nm	cub	extracelular	[78]
Klebsiella oxytoca	ferihidrit	-	_	extracelular	[79]

Tabelul 1.1. Microorganisme utilizate în sinteza microbiologică a nanoparticulelor de fier [65]

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. Studierea structurii proteinelor și a proceselor biochimice ale acestora conduce la o înțelegere mai bună a procesului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor, ceea ce va permite îmbunătățirea parametrilor de structură a nanoparticulelor pentru diferite aplicații.

1.4. Aspectele fizico-chimice ale mecanismului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor de fier

Fierul este un metal esențial pentru microorganisme deoarece este implicat în diferite procese fiziologice intracelulare. Ionii de fier sunt utilizați de către microorganisme în transportul oxigenului molecular și reacțiile de transfer de electroni. De asemenea, fierul este folosit de către microorganisme pentru sinteza unor enzime ce catalizează reacțiile biochimice din interiorul celulei [80]. Creșterea concentrației fierului intracelular conduce la inițierea unor reacții nefavorabile pentru celula vie rezultând în modificarea structurală sau distrugerea proteinelor [81]. Astfel, ionii de fier catalizează reacțiile chimice și formarea radicalilor liberi.

Radicalii liberi sunt responsabili de stresul oxidativ intracelular ducând la distrugerea proteinelor de structură. Din acest motiv microorganismele au dezvoltat mecanisme de reglare a concentrației fierului atât în mediul intracelular cât și în cel extracelular. O varietate de mecanisme specifice sau nespecifice pot fi atribuite transformărilor redox, reacțiilor de chelare intracelulară sau reacțiilor de precipitare intracelulară și extracelulară, care se realizează cu participarea unor proteine sau liganzi sintetizați de către celulele vii ale microorganismelor. De cele mai dese ori excesul de fier este depozitat în feritină sau incluziuni citoplasmatice [82]. Înțelegerea acestor procese la nivel molecular este o problemă fundamentală pentru sinteza microbiologică a particulelor nanostructurate.

De exemplu, s-a identificat că în condiții microaerofile, tulpina bacteriei *Klebsiella oxytoca* produce extracelular și intracelular nanoparticule de ferihidrit [83-87]. Studiile au arătat că aceste nanoparticule sunt produse în rezultatul proceselor de biominerealizare a citratului feric din mediul nutritiv al bacteriei. În cadrul studiilor mecanismelor care stau la baza sintezei microbiologice cu participarea tulpinii *Klebsiella oxytoca* s-a determinat că nanoparticulele produse intracelular sunt încapsulate într-un material organic de tip proteină [88], pe când cele produse extracelular sunt înglobate într-o matrice de polizaharidă [89]. De asemenea, s-a stabilit că bacteria *Klebsiella oxytoca* produce două tipuri de ferihidrit ca rezultat al variației condițiilor de cultivare a tulpinii bacteriene. Această diferențiere a fost observată în probele uscate cu

ajutorul spectroscopiei Mössbauer, măsurătorilor magnetice statice și difracția de raze-X [88, 90]. Proprietățile structurale și morfologice ale nanoparticulelor de ferihidrit au fost studiate utilizând spectroscopia în domeniul infraroșu și spectroscopia Raman. În cadrul experimentelor de împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X, au fost studiate nanoparticulele de ferihidrit dispersate în apă și tratate la ultrasunet. Rezultatele acestui studiu au arătat că particulele de ferihidrit au forma alungită și dimensiunea razei de girație de $6,73 \pm 0,16$ nm, fiind înglobate într-o matrice de exopolizaharidă [89, 91]. O descriere mai detaliată a cercetărilor legate de structura și morfologia nanoparticulelor de ferihidrit sintetizate de bacteria *Klebsiella oxytoca* este redată în două articole publicate în reviste științifice internaționale cu recenzenți *SAXS studies of ultrasonicated dispersions of Biomineral particles produced by Klebsiella oxytoca* [91] și *Characterization of bio-synthesized nanopartices produced by Klebsiella oxytoca* [89].

Un alt exemplu îl constituie tulpina celulelor fungice *Saccharomyces cerevisiae*. S-a stabilit că în procesul de formare a nanoparticulelor pe bază de fier în mitocondriile celulelor *Saccharomyces cerevisiae* este implicată proteina mitocondrială frataxina [92].

Mecanismele care stau la baza 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 [93].

La modul general, mecanismul care stă la baza sintezei microbiologice poate fi descris ca un proces alcătuit din două etape. Prima etapă constă în absorbția speciilor organice sau anorganice ale metalelor, atât solubile cât și insolubile prin mecanisme fizico-chimice precum adsorbția. Schema generală a proceselor fizico-chimice ce se realizează la suprafața celulei microbiene pentru legarea ionilor metalici din mediu este redată în Figura 1.2. Aceste reacții se realizează datorită grupelor funcționale de pe suprafața peretelui celular al microorganismelor, capabile să lege ionii metalelor. Totalitatea acestor procese a fost definită ca procese de biosorpție. Prefixul "bio" se referă la utilizarea entităților biologice precum celule vii sau moarte, țesuturi, componente ale peretelui celular sau proteine în calitate de substanțe adsorbante. A doua etapă se realizează prin reacțiile de oxido-reducere care implică participarea proteinelor membranare responsabile pentru captarea ionilor metalelor din mediul celular. Această etapă se finalizează cu transportarea ionilor metalelor prin membrana celulară, depozitarea acestora în incluziuni citoplasmatice sau feritină și formarea nanoparticulelor intracelulare. Etapa a doua a procesului de sinteză microbiologică a fost definită etapa de biomineralizare. Totalitatea proceselor ce se petrec în a doua etapă au fost definite ca procese de biomineralizare [30].



Fig. 1.2. Schema generală de imobilizare a speciilor metalice din mediu prin procesele fizicochimice de la suprafața celulei microbiene [94].

1.4.1. Biosorpția

Microorganismele sunt cunoscute pentru capacitatea naturală de a adsorbi ionii metalici și în special a metalelor grele din mediu [95]. Datorită acestei trăsături, biomasa celulară a căpătat o atenție deosebită din partea cercetătorilor pentru aplicațiile potențiale în domeniul biosorbenților utilizați pentru tratarea apelor uzate, devenind gradual un subiect de top în domeniul controlului poluării cu metale, în ultimele decenii. Această direcție de cercetare este susținută de necesitatea de a dezvolta noi tehnologii de eliminare a poluanților din apele uzate, care să fie prietenoase cu mediul și necostisitoare [96].

Proprietatea biomasei celulare vii sau moarte de a lega ionii metalici din mediu a fost definită ca biosorbție. Însă, în literatura de specialitate, biosorbția este utilizată ca termen specific pentru a defini metodele în care sorbenții de origine biologică sunt utilizați pentru îndepărtarea substanțelor de origine organică sau anorganică din soluțiile apoase. Cercetările au arătat că biosorbția poate fi utilizată cu succes pentru recuperarea metalelor prețioase, radionuclidelor, a unor proteine, steroizi și produse farmaceutice [97].

Biosorbția ionilor metalici se realizează printr-o multitudine de procese fizico-chimice ce au loc concomitent sau separat la suprafața celulară a microorganismelor utilizate [98, 99]. S-a identificat că mecanismele care stau la baza acestor procese sunt diferite și depind de speciile ionilor metalelor dar și de proprietățile biomasei celulare utilizate.

Selectarea corectă a microorganismelor adecvate pentru biosorbția ionilor metalici necesită cunoașterea mai multor caracteristici atât ale procesului de reținere a ionilor metalici cât și ale microorganismelor, cum sunt: mecanismele care stau la baza procesului de reținere a ionilor metalici, cunoașterea metabolismului specific, factorii care influențează capacitatea de reținere ș.a. Pentru a obține o biosorbție eficientă și reproductibilă a metalelor din soluția apoasă sunt selectate tulpinile microorganismelor cu capacitate înaltă de sorbție a ionilor metalici. Aceste microorganisme au o toleranță sporită față de ionii metalici. Rezistența unor tulpini de microorganisme în soluții de concentrații mari de ioni metalici se datorează unuia sau mai multor mecanisme care includ:

- legarea ionilor metalici pe suprafața celulară;
- precipitarea pe suprafața celulară;
- sinteza unor agenți de chelare care pot servi la complexarea și astfel reținerea ionilor metalici din soluție;
- oxido-reducerea enzimatică ce duce la transformarea formei toxice a elementului în forma mai puțin toxică;
- dezvoltarea unor sisteme de transportare și depozitare în interiorul celulei.

Apelând la aceste mecanisme de toleranță, microorganismele pot reține metalele din mediile apoase. Mecanismele enumerate mai sus se realizează prin combinarea mai multor procese precum complexare, coordinare, chelare, schimb ionic, microprecipitare și fixare a ionilor metalelor în matricea polizaharidelor ca urmare a gradientului de concentrație și difuzie prin peretele celular al microorganismelor [100, 101]. De asemenea, s-a arătat că mecanismul biosorbției este unul diferit în cazul celulelor metabolic inactive sau moarte, față de mecanismul celulelor vii (Figura 1.3).



Fig. 1.3. Mecanismele biosorbției [102].

Eficacitatea reținerii ionilor metalici din mediul apos depinde în mare parte de structura peretelui celular și a membranei celulare. Astfel, pentru a asigura un randament mai bun al biosorbției ionilor metalici trebuiesc identificate și studiate componentele celulare responsabile de legarea metalelor, compoziția chimică a biomasei celulare și determinate grupele funcționale active de la suprafața celulară. Cercetările orientate în acest sens arată că biomasa celulară are o compoziție chimică complexă, iar compoziția chimică a peretelui celular și numărul grupelor funcționale (Tabelul 1.2) de pe suprafața peretelui celular al microorganismelor responsabile de legarea ionilor metalelor vor influența direct aceste procese [103].

Grupa funcțională	рКа	Atomul-ligand	Biomoleculele				
Hidroxil	9,5 - 13,0	0	polizaharide, acidul uronic,				
			aminoacizi, sulfopolizaharide				
Carbonil	_	Ο	Peptide				
Carboxil	1,7-4,7	Ο	acidul uronic, aminoacizi				
Sulfhidril	8,3 - 10,8	S	Aminoacizi				
Tiol	1,3	Ο	Sulfopolizaharide				
Tioeteri	_	S	Aminoacizi				
Amino	8,0-11,0	Ν	chitosan, aminoacizi				
Amina secundară	13,0	Ν	peptidoglicani, aminoacizi				
Amidă	_	Ν	Aminoacizi				
Imida	11,6-12,6	Ν	Aminoacizi				
Imidazol	6,0	Ν	Aminoacizi				
Fosfonat	6,1 – 6,8	Ν	Polifosfolipide				
Fosfodiester	13,0	Ν	acidul teichoic, lipopolizaharide				

Tabelul 1.2. Grupele funcționale din biomasa celulară responsabile de legarea ionilor metalici din solutie [103]

Cercetările au arătat că biosorpția ionilor metalelor de către celulele microorganismelor este influențată de următorii factori:

- morfologia celulelor;
- temperatura;
- pH-ul mediului;
- speciația chimică a metalelor în mediul apos;
- concentrația cationilor și anionilor în mediu [104].

Morfologia celulelor tulpinilor utilizate influențează direct procesele ce se realizează în cadrul biosorbției ionilor metalici. De exemplu, s-a constat că biomasa bacteriană reține ionii metalici prin procese de micro-precipitare sau complexare prin liganzii extracelulari sintetizați de celula bacteriană, sau atomii-liganzii N și O din componența peretelui celular. Micro-precipitarea este precedată de legarea de grupele funcționale ale componentelor peretelui celular rezultând în generarea unor puncte de nucleație. Principalele componente ale peretelui celular bacterian sunt peptidoglicanii, acizii teichoici și acizii teichuronici. Peptidoglicanii sunt heteropolimeri lineari alcătuiți din componentul glicanic și unul peptidic. Partea glicanică este o polizaharidă constituită din N-acetil-glucozoamina și acidul N-acetil-muramic legat de o componentă peptidică (Figura 1.4). Partea peptidică este fixată de acidul muramic și este alcătuită din aminoacizi precum acidul aspartic, lizină, cisteină sau asparagină. Acizii teichoici sunt componente polizaharidice constituite din resturi de ribitol sau glicerol unite prin legături difosforice (Figura 1.4).



Fig. 1.4. Componenți ai peretelui celular bacterian.

S-a constatat că grupările carboxilice și cele fosforice sunt responsabile de legarea ionilor metalici din mediu. În cazul bacteriilor gram-negative, peptidoglicanii constituie doar 10 % din masa uscată a peretelui celular. Celulele bacteriilor gram-negative sunt acoperite cu o membrană externă alcătuită dintr-un strat dublu lipidic cu proteine inserate. Grupele fosfat ale acestei membrane acționează ca și captatori de ioni metalici [105].

Peretele celular al celulelor fungice este constituit 90 % din polizaharide precum celuloză și glucan, chitină și chitosan (Figura 1.5) sau chitină și glucan. Grupele carboxilice și cele fosforice ale componentelor peretelui celular sunt responsabile de captarea ionilor metalici din mediu. Peretele celular al celulelor fungice este constituit 10 % din componente proteice, însă

după cum s-a stabilit, contribuția acestora în procesele de sorbție a cationilor metalici este nesemnificativă. S-a stabilit că celulele fungice acumulează cantități sporite de metale grele din mediul apos, fiind utilizate cu succes pentru decontaminarea apelor uzuale [106]. La fel ca și în cazul celulelor fungice și bacteriene, biosorbția metalelor grele de către celulele algelor este influențată de structura suprafeței celulare. S-a identificat că suprafața celulară a algelor este constituită din polizaharide precum celuloză, hemiceluloză, chitină, pectine, alginați [107]. În literatura de specialitate se specifică că anume grupele carboxilice, hidroxil, sulfat și amino ale componentelor suprafeței celulare sunt responsabile de fixarea ionilor metalici din mediu.



Fig. 1.5. Componenți ai peretelui celular al celulelor fungice.

Procesele fizico-chimice ce au loc la suprafața celulară, dar și activitatea metabolică a celulelor, sunt influențate de temperatura mediului nutritiv . Însă, s-a arătat că temperaturile în intervalul de 20-35 $^{\circ}$ nu vor influența procesul de sorbție microbiologică, pe când temperaturile mai joase vor duce la inhibarea activității celulare.

Unul dintre factorii principali ce afectează sorbția microbiologică este pH-ul soluției, întrucât acesta influențează speciația chimică a cationilor metalici. Mai mult, pH-ul soluției determină starea de protonare a grupelor funcționale de pe suprafața celulară. La un pH acid protonii vor concura cu ionii metalici pentru completarea grupelor funcționale. Astfel, protonarea grupărilor funcționale ale suprafeței celulare va diminua randamentului biosorbției ionilor metalici.

Studierea acestor factori și evaluarea impactului acestora asupra procesului de biosorbție este importantă din punct de vedere al elaborării metodologiilor de sinteză microbiologică a structurilor de dimensiuni nanometrice.

1.4.2. Biomineralizarea

Biomineralizarea sau mineralizarea biologică reprezintă totalitatea proceselor metabolice, reacțiilor de oxido-reducere care implică participarea proteinelor responsabile pentru captarea ionilor de metale din mediul celular, transportarea și depozitarea acestora [108]. Această categorie de reacții depinde de căile metabolice specifice tulpinii microorganismelor utilizate, dar și de proteinele implicate precum transferinele și oxidazele [109]. În literatura de specialitate termenul de *"biomineralizare"* este utilizat pentru a defini procesul general prin care organismele produc unele structuri minerale sau parțial minerale. În prezent sunt cunoscute mai mult de 60 de minerale produse de către entitățile biologice ca rezultat al procesului de biomineralizare [110].

În literatura de specialitate sunt descrise unele mecanisme care stau la baza sintezei microbiologice a nanoparticulelor de fier. În acest context, s-a stabilit că la baza producerii nanoparticulelor cu participarea microorganismelor stă procesul de mineralizare biologică care poate fi diferențiat în mineralizare biologică indusă și mineralizare biologică controlată [111].

Mineralizarea biologică indusă este definită ca multitudinea de procese fizico-chimice care au loc la suprafața celulară cu participarea metaboliților produși de celulele microorganismelor care favorizează nucleația și formarea structurilor biominerale de dimensiuni nanometrice. Unele tulpini de microorganisme sintetizează molecule organice pentru captarea ionilor metalici din mediu, sau adsorbiți pe suprafața peretelui celular. Concentrațiile sporite ale acestor compuși la suprafața celulară induc inițierea proceselor de nucleație ce rezultă în formarea de structuri minerale sau biominerale. În literatura de specialitate sunt descrise mai multe tulpini capabile de a sintetiza nanoparticule pe bază de fier prin metoda de mineralizare biologică indusă. De exemplu, s-a constat că tulpinile bacteriilor fier-reducătoare precum Geobacter metallireducens și Shewanella putrifaciens pot fi utilizate pentru sinteza nanoparticulelor de magnetită. Aceste microorganisme au capacitatea de a metaboliza diferite substanțe organice sau anorganice, utilizând compuși de Fe(III) ca acceptori finali de electroni, pe care îi reduc la compuși solubili de Fe(II). Compușii feroși eliberați în mediu, în continuare, sunt adsorbiți pe suprafața hidroxidului de Fe(III). Formarea magnetitei este favorizată de pH-ul ridicat al mediului. Reducerea ionilor de Fe(III) conduce la mărirea pH-ului mediului. Cantitatea de magnetită produsă de bacteriile fier-reducătoare depinde de concentrația fosforului anorganic în mediu dar și de concentrația ionilor de Fe(III) [112]. În acest caz, nanoparticulele de magnetită se formează în proximitatea celulelor microorganismelor. Un alt exemplu îl constituie grupul de bacterii sulfat-reducătoare. Acest grup de bacterii este cunoscut pentru reducerea sulfului la sulfură în condiții anaerobe. S-a constatat că speciile precum Desulfuromonas și Actinobacter pot fi utilizate pentru sinteza nanoparticulelor pe bază de fier cu proprietăți magnetice.

Mecanismul care stă la baza producerii nanoparticulelor de fier cu participarea acestor bacterii constă în reducerea fierului trivalent la fier divalent cu participarea ionilor sulfhidril. În continuare, compuşii feroși interacționează cu hidroxidul Fe(III) din mediu formând magnetita.

Mineralizarea biologică controlată este definită ca totalitatea de procese fizico-chimice controlate de celulele microorganismelor ce contribuie la formarea intracelulară a nanoparticulelor. În cadrul mineralizării biologice controlate celulele microorganismelor produc polimeri organici în matricea cărora sunt depozitați ionii metalici sau vezicule citoplasmatice, sau proteine precum feritina. Un exemplu de bază în acest context îl constituie bacteriile magnetotactice. Aceste bacterii produc intracelular particule de magnetită sau greigit depozitate în incluziuni citoplasmatice denumite magnetozomi. Bacteriile magnetotactice au fost descoperite în 1963 și sunt cunoscute pentru proprietatea de a se orienta după câmpul magnetic terestru datorită magnetozomilor din structura celulară [113]. Mecanismul care stă la baza producerii magnetozomilor este complex și constă din mai multe procese precum producerea veziculelor citoplasmatice, biosorbția extracelulară a fierului, transportarea fierului și depozitarea acestuia în vezicule, mineralizarea fierul depozitat cu formare de magnetită și greigit. În Figura 1.6. este prezentată schema reacțiilor posibile ce conduc la formarea magnetitei biomineralizate în tulpinile speciilor de bacterii magnetotactice [114].



Fig. 1.6. Schema reacțiilor posibile ce conduc la formarea magnetitei biomineralizate în tulpinile speciilor de bacterii magnetotactice.

Mecanismul formării magnetozomilor diferă între speciile bacteriilor magnetotactice. De exemplu, s-a arătat că spre deosebire de tulpina *Magnetospirillum gryphiswaldense*, tulpinile *Magnetospirillum magnetotacticum*, *Magnetospirillum magneticum* şi MV-1 leagă Fe(III) din mediu prin intermediul sideroforilor. În interiorul celulei, fierul legat de siderofori este redus la Fe(II). În cazul tulpinii MV-1, s-a identificat că Fe(II) din mediu este transportat în interiorul celulei cu ajutorul Fe(II)-oxidazei periplasmice identificată în spațiul periplasmic al bacteriei magnetotactice. Proteine citoplasmatice capabile de oxidarea sau reducerea fierului au fost identificate în celulele tulpinii *Magnetospirillum magnetotacticum*. De asemenea, s-a stabilit că membrana magnetozomilor conține proteine specifice precum feritina.

Feritina (Figura 1.7) este un complex globular proteic intracelular, construit din 24 unități proteice în structura căruia se depozitează fierul intracelular, sub formă de ferihidrit. În interiorul feritinei fierul este oxidat prin intermediul feroxidazei [100, 115]:

$$Proteina + 2Fe^{2+} + O_2 + 3H_2O \to Proteina - [Fe_2O(OH)_2] + H_2O_2 + 2H^+$$
(1.1)

 $Proteina - [Fe_2O(OH)_2] + H_2O \rightarrow Proteina + 2FeOOH_{nuleu} + 2H^+$ (1.2)

 $4Fe^{2+} + O_2 + 6H_2O \to 4FeOOH_{nuleu} + 2H^+$ (1.3)



Fig. 1.7. Reprezentarea grafică a feritinei (PDB cod 1FHA).

S-a identificat că fierul depozitat în veziculele magnetozomilor inițial se transformă în ferihidrit, o treime din fierul depozitat este redus, iar mai apoi adsorbit pe suprafața ferihidritului, care prin deshidratare se transformă în magnetită [113].

Experimental, s-a stabilit că mecanismele care stau la baza formării nanoparticulelor de magnetită în bacteria magnetotactică pot fi atribuite și pentru alte culturi de bacterii precum *Shewanella putrefaciens*, care în condiții microaerofile produce nanoparticule pe bază de fier cu diametrul de 30-50 nm [114].

După cum s-a stabilit, transportarea fierului în interiorul celulei microorganismelor se realizează cu participarea unor proteine precum cupru-oxidaza (Fet3p), transferina, lactoferina, ferioxidaza ș.a. [114]. Reprezentarea grafică a acestor proteine este expusă în Figura 1.8.



Fig. 1.8. Reprezentarea grafică a moleculelor proteice de transferină, lactoferină, cupru-oxidază și ferioxidază.
Astfel, pentru eficientizarea metodelor microbiologice de sinteză a nanoparticulelor este necesară studierea mecanismelor care stau la bază, identificarea proceselor fizico-chimice și a moleculelor organice implicate în procesele ce conduc la formarea extracelulară sau intracelulară a nanostructurilor de interes științific. După cum s-a menționat anterior, multe procese, în cadrul sintezei microbiologice a nanostructurilor metalice, decurg cu participarea proteinelor, enzimelor sau moleculelor siderofore. Caracterizarea fizico-chimică a acestor molecule va contribui la înțelegerea mai bună a mecanismelor implicate. Cunoașterea mecanismelor moleculare care stau la baza sintezei microbiologice a nanoparticulelor este necesară pentru controlul formei, dimensiunilor și cristalinității nanoparticulelor.

1.5. Concluzii la capitolul 1

Metodele biologice de sinteză a nanoparticulelor reprezintă o categorie aparte ce implică utilizarea enzimelor microbiene, agenților fitochimici cu proprietăți oxidante sau reducătoare, sau utilizarea directă a microorganismelor pentru sinteza nanoparticulelor. Implementarea acestui set de metode oferă posibilitatea de a obține nanoparticule ale căror proprietăți sunt compatibile cu proprietățile biochimice ale mediului celular.

S-a stabilit că în condiții normale de temperatură și presiune, celulele intacte sau tratate în prealabil ale microorganismelor dispersate în soluțiile sărurilor unor metale produc particule de dimensiuni nanometrice.

Cercetările la nivel internațional au demonstrat capabilitatea mai multor organisme, atât unicelulare cât și pluricelulare, de a sintetiza materiale anorganice, fie intracelular sau extracelular. 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. Studierea structurii proteinelor și a proceselor biochimice ale acestora va conduce la o înțelegere mai bună a procesului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor, ceea ce va permite îmbunătățirea parametrilor de structură a nanoparticulelor pentru diferite aplicații.

Problema de cercetare care reiese din analiza efectuată, constă în necesitatea de a evalua procesul de sinteză microbiologica a nanoparticulelor pentru optimizarea acestuia, ceea ce va asigura modificarea dirijată a parametrilor de structură a nanoparticulelor pentru diferite aplicații.

Direcțiile de soluționare a problemei evidențiate constau în elaborarea unei metodologii de testare a microorganismelor pentru determinarea capabilității de sinteză a nanoparticulelor la

nivel de laborator, identificarea factorilor ce favorizează sinteza nanoparticulelor și cercetarea unor proteine implicate în procesul de sinteză microbiologică a nanoparticulelor.

Pentru soluționarea problemei evidențiate s-a formulat *scopul* global al prezentei teze de doctorat, care constă în studierea aspectelor fizico-chimice și mecanismului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor pe bază de fier.

Pentru realizarea scopului propus, au fost formulate următoarele obiective generale:

- elaborarea unei metodologii de testare a microorganismelor pentru identificarea capabilității de a sintetiza nanoparticule 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 procedeului de sinteză dirijată a nanoparticulelor de fier.

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

Algele constituie un grup mare și diversificat de organisme unicelulare și multicelulare. Majoritatea grupelor de alge sunt considerate fotoautotrofe, ce depind în întregime de aparatul fotosintetic în procesele metabolice pentru sinteza carbohidraților și a ATF-ului (adenozintrifosfat). Algele sunt cultivate în scopuri comerciale întrucât acestea constituie o sursă viabilă de carotenoizi, pigmenți, proteine și vitamine, ce sunt utilizați în industria alimentară, farmaceutică și cosmetică. Printre cele mai utilizate tulpini de microalge pentru producția comercială pe scară largă se numără *Dunaliella, Haematococcus, Arthrospira* și *Chlorella* [116].

În ultimele decenii, algele au devenit un obiect de studiu în domeniul biosorbenților datorită capacității de adsorbție sporită și disponibilității aproape nelimitate în oceane. Literatura de specialitate confirmă faptul că algele pot fi considerate ca o alternativă la materialele adsorbante convențional utilizate în tratarea apelor contaminate cu metale grele [105]. Mai mult ca atât, literatura de specialitate arată că algele nu doar acumulează cationii metalici prin reactiile de chelare și transformare chimică dar și sunt capabile de producerea unor structuri bio-minerale de dimensiuni nanometrice. De exemplu, s-a constat că microalgele verzi Chlorella vulgaris prezintă afinitate sporită față de ionii de tetraclorură de aur. Celulele acestei microalge leagă ionii de tetraclorură de aur din mediul extracelular și treptat îi reduce până la Au⁰. Astfel, s-a determinat că aproximativ 88% din aurul legat era redus până la Au⁰, iar cristalele formate sunt depozitate extracelular și intracelular. Un alt exemplu este microalga verde-albăstrie Spirulina platensis utilizată pentru producerea extracelulară a nanoparticulelor de aur, argint, precum și nanoparticulelor bimetalice Au/Ag. Tulpinile algelor Sargassum wightii și Kappaphycus *alvarezii* sunt alte exemple menționate în literatura de specialitate ca microorganisme capabile de producerea extracelulară a nanoparticulelor bio-minerale [117]. Compoziția chimică și proprietățile de suprafață ale nanoparticulelor obținute prin sinteza microbiologică sunt adaptate astfel încât să răspundă forțelor biochimice și biomecanice, reacțiilor celulare.

Totalitatea proceselor care stau la baza producerii microbiologice ale nanoparticulelor bio-minerale sunt însumate în două mecanisme principale. Primul mecanism este cel de biosorbție, acesta reprezintă suma interacțiunilor pasive de la suprafața externă a celulelor inclusiv reacțiile de adsorbție, de schimb ionic cu grupele funcționale de la suprafața celulară și cele de complexare. Al doilea mecanism este cel de bioacumulare. Spre deosebire de biosorbție, bioacumularea este un mecanism metabolic activ ce include reacțiile de complexare, transportare și acumulare a ionilor metalici în interiorul celulelor. Acest mecanism se realizează cu scopul de a proteja celulele de toxicitatea indusă de concentrații sporite ale ionilor metalici în mediu sau pentru acumularea ionilor metalici esențiali pentru procesele biochimice celulare. Un alt aspect ce deosebește bioacumularea de biosorbție sunt reacțiile ireversibile.

În cazul microalgelor, în literatura de specialitate sunt descrise două strategii de bază ale sorbției ionilor metalici din mediul extracelular: participarea moleculelor siderofore și participarea oxido-reducătorilor. Pentru a înțelege mecanismele și procesele care stau la baza metodei microbiologice de sinteză a nanoparticulelor este necesar de realizat studii pentru cercetarea aspectelor precum: selectivitatea speciilor de alge, modelarea și simularea proceselor de sorbție microbiologică a cationilor metalici de interes.

2.1. Tulpina Dunaliella salina ca model de studiu

Dunaliella salina este o microalgă verde unicelulară ce se adaptează ușor în mediu hipersalin ce conține concentrații de NaCl până la 5,50 M [118]. Celulele bi-flagelate ale *Dunaliellei salina* sunt de formă ovoidală sau sferică (Figura 2.1). Lipsite de un perete celular, celule *Dunaliellei salina* sunt înconjurate de o membrană plasmatică elastică. Datorită acestui aspect structural al celulei, *Dunaliella salina* este puternic influențată de schimbările osmotice din mediu [119]. Microalgele verzi *Dunaliella salina* sunt răspândite în oceane, mări, lacuri sărate. Tulpina *Dunaliellei salina* este una dintre cele mai bogate surse naturale de β -caroten. De asemenea, această microalgă este bine cunoscută pentru productivitatea sporită de glicerol.



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.

Inițial, *Dunaliella salina* a fost propusă ca sursă comercială de β -caroten, iar mai târziu ca sursă de glicerol. Prima instalație pilot de cultivarea *Dunaliellei salina* pentru producerea β -carotenului a fost înființată în URSS în anul 1966. Actualmente, β -carotenul produs de tulpina microlagei *Dunaliellei salina* este utilizat la scară comercială în mai multe țări, precum Australia, Statele Unite ale Americii și Israel [120].

Dunaliella salina este cunoscută pentru rezistență la variația bruscă a condițiilor osmotice, deoarece puține specii tolerează variațiile bruște ale factorilor de mediu. Această caracteristică a tulpinii se datorează faptului că *Dunaliella salina* produce intracelular cantități considerabile de glicerol pentru a menține echilibrul osmotic și pentru protejarea enzimelor și proteinelor citoplasmatice [120]. β -Carotenul este sintetizat de către celulele *Dunaliellei salina* ca măsură de protecție împotriva iluminării intense. În condiții de salinitate înaltă, celule *Dunaliellei salina* produc cantități sporite de carotenoizi [121], lipide [122], vitamine [123] și proteine [124], cu valoare comercială. Datorită acestor proprietăți, *Dunaliella salina* a devenit una dintre cele mai studiate tulpini de microalge verzi și un organism model pentru cercetarea mecanismelor de adaptare în condiții de salinitate substanțial ridicată.

Un interes științific aparte prezintă proprietatea *Dunaliellei* de a adsorbi ionii metalici din soluții apoase, precum și capacitatea de bio-remediere a acesteia. În lucrările științifice publicate, sunt raportate studii de sorbție a ionilor de cadmiu, arseniu, plumb, mercur și aluminiu [125-129] de către tulpina *Dunaliellei salina*. O observație importantă în acest sens, este că *Dunaliella salina* are o afinitate sporită față de metalele grele. S-a arătat că, în aceleași condiții, celulele *Dunaliellei salina* prezintă o tendință mare de acumulare a ionilor de cadmiu [130]. Această microalgă verde are o selectivitate sporită a sistemului de transport a ionilor de fier trivalent, caracterizat de un proces neobișnuit de acumulare a ionilor de fier din mediu [131]. Acesta constă din:

- (I) etapa de legare a fierului din mediu, care ar putea fi atribuită proceselor de biosorbție la suprafața celulară;
- (II) etapa de transportare a fierului în interiorul celulei, ce se datorează proceselor metabolice din etapa de acumulare.

Ambele etape se realizează cu participarea unei proteine, identificată ca membru al familiei de transferine. Specificitatea procesului de legare a fierului constă în producerea acestei proteine, de tip transferină, care este un fenomen deosebit, întrucât în literatura de specialitate nu există indicații anterioare despre plante sau alte specii de alge care să producă acest tip de proteine. Mai mult ca atât, s-a stabilit că producția acestei proteine este amplificată în mediul deficitar de fier

cu salinitate substanțial ridicată [132]. De asemenea, s-a identificat că fierul legat din mediul extracelular este transportat treptat și acumulat în vacuole, care în acest caz servesc drept depozite pentru fier [133]. Reieșind din caracteristicile morfologice expuse mai sus, celulele *Dunaliellei salina* au fost selectate pentru studierea factorilor esențiali în procesul de sinteză microbiologică a nanoparticulelor de fier. Studiile realizate în cadrul acestei etape s-au axat pe cercetarea factorilor esențiali și identificarea condițiilor optime pentru desfășurarea procesului de acumulare a ionilor de fier și formare a nanoparticulelor pe bază de fier.

2.2. Metodologia studiului de sorbție microbiologică a ionilor de fier de către celulele tulpinii *Dunaliellei salina*

Studiile de sorbție microbiologică a ionilor de fier s-au realizat prin expunerea suspensiei de biomasă celulară vie ale tulpinii *Dunaliella salina* de concentrație de 0,35 g/L la un mediu apos în care se conținea acidul N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etan sulfonic) (HEPES) și citratul de fier (III). HEPES-ul a fost utilizat în calitate de agent de tamponare pentru a reduce riscul lizării celulelor vii.

Complexul Fe(III)-EDTA este pe larg utilizat ca sursă de ioni de fier în studiile de sorbție microbiologică a fierului de microalgele marine. Complexul Fe(III)-EDTA este unul foarte stabil, cu valoarea constantei de stabilitate de 25,7, pe când valoarea estimată a constantei de stabilitate a citratului de fier (III) este de 19,1. Astfel, pentru a asigura o sorbție mai eficientă, citratul de fier (III) (Sigma-Aldrich, bio-reagent pentru cultivarea biomasei celulare) a fost utilizat în calitate de sursă de fier trivalent în studiile de sorbție microbiologică.

Valoarea pH-ului în sistemele studiate a fost ajustată cu ajutorul soluțiilor proaspăt preparate de 0,1 M NaOH și 0,1 M HCl.

Pentru a evalua performanța procesului de sorbție microbiologică, eșantioane de un volum de câte 1 mL erau colectate în anumite intervale de timp. Biomasa celulară era separată prin centrifugare la 13000 rpm timp de 5 min, iar supranatantul era utilizat pentru determinarea concentrației fierului. De asemenea, a fost analizat eșantionul de referință ce conținea doar mediul de cultivare și ioni de fier, pentru a confirma că supranatantul ce conținea fier nu este afectat de alți factori decât cei generați de biomasa *Dunaliellei salina* pe parcursul experimentelor de laborator.

Concentrația ionilor de fier trivalent în supranatant a fost determinată utilizând metoda spectrofotometrică cu hexacianoferatul (III) de potasiu (λ =610 nm) [134, 135]. Această metodă are la bază interacțiunea ionilor Fe³⁺ cu hexacianoferatul (III) de potasiu și formarea albastrului de Prusia, a cărui concentrație poate fi determinată spectrofotometric. O ecuație matematică

(y=a+bx) care exprimă corelația liniară dintre absorbanța eșantioanelor și concentrația fierului a fost utilizată în continuare în studiile de evaluare a procesului de sorbție biologică a ionilor de fier.

Pentru evaluarea capacității celulelor *Dunaliellei salina* de acumulare a ionilor de fier este importantă cercetarea factorilor ce influențează performanța sorbției microbiologice a acesteia. În acest sens a fost urmărit procesul de sorbție microbiologică a ionilor de fier din mediul extracelular în funcție de factorii operaționali responsabili de realizarea procesului de sorbție microbiologică:

- timpul de contact;
- cantitatea de biomasa utilizată;
- valoarea pH-ului inițial;
- concentrația inițială a ionilor de fier în mediu;
- prezența fierului în mediul de cultivare a celulelor;
- prezența altor specii în mediu;
- efectul salinității mediului de cultivare.

Rezultatele acestor studii vor contribui la identificarea condițiilor necesare care conduc la formarea nanoparticulelor biogene.

Sorbția fierului de către biomasa celulară a *Dunaliellei salina* a fost calculată utilizând expresia matematică:

$$q = \frac{V(C_0 - C_t)}{S} \tag{2.1}$$

q este cantitatea de fier adsorbit (mg metal/g de biomasă uscată);

V volumul soluției de citrat de fier (III) în contact cu biomasa celulară (L);

 C_0 este concentrația inițială a citratul de fier (III) (mg/L);

 C_t este concentrația citratului de fier (III) (mg/L) după un interval de timp t;

S este masa biomasei dispersate în mediul îmbogățit cu citratul de fier (III) (g) [136].

Procesul de sorbție microbiologică a ionilor de fier a fost descris prin modelele izotermelor de adsorbție Langmuir, Freundlich și Dubinin-Radushkevich, acestea fiind cel mai des utilizate pentru descrierea proceselor de sorbție biologică.

Izotermele de adsorbție sunt modele matematice care descriu modalitatea în care substanța sorbită reacționează cu sorbentul, și furnizează informații despre natura interacțiunilor dintre adsorbat și sorbent.

Modelul izotermei de adsorbție Langmuir este utilizat pentru evaluarea performanței diferitor biosorbenți. Acest model matematic se bazează pe presupunerea că maximul de

adsorbție corespunde unui monostrat saturat de molecule adsorbite pe suprafața adsorbantului. Conform acestei teorii, odată ce o moleculă a ocupat un centru activ, nici o altă sorbție nu poate avea loc pe centrul respectiv, de asemenea sunt excluse posibilele interacțiuni moleculare dintre centrii activi ai adsorbantului. Derivata izotermei de adsorbție Langmuir se referă la adsorbția omogenă în care toți centrii activi posedă aceeași afinitate pentru adsorbat, iar moleculele adsorbatului nu migrează în planul suprafeței adsorbantului. Modelul izotermei de adsorbție Langmuir este exprimat prin următoarea expresie matematică:

$$q_e = \frac{Q_0 b C_e}{1 + b C_e} \tag{2.2}$$

 q_e este capacitatea de adsorbție (mg metal/g de biomasă uscată);

 C_e este concentrația adsorbatului la echilibru (mg/L);

b este constanta Langmuir a echilibrului de sorbție (L/mg);

 Q_0 este capacitatea de formare a monostratului (mg/g).

 Q_0 și *b* sunt determinate din forma liniară a ecuației modelului izotermei de adsorbție Langmuir. Forma liniară a ecuației izotermei de adsorbție Langmuir este exprimată prin relațiile matematice prezentate în Tabelul 2.1.

		,]
	Expresia liniară a izotermei Langmuir	Grafic
Tip 1	$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{bQ_0} + \frac{C_e}{Q_0}$	$\frac{C_e}{q_e}$ în funcție de C_e
Tip 2	$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{Q_0} + \frac{1}{bQ_0C_e}$	$\frac{1}{q_e}$ în funcție de $\frac{1}{C_e}$
Tip 3	$q_e = Q_0 - \frac{q_e}{bC_e}$	q_e în funcție de $\frac{q_e}{C_e}$
Tip 4	$\frac{q_e}{C_e} = bQ_0 - bq_e$	$\frac{q_e}{C_e}$ în funcție de q_e

Tabelul 2.1.	. Ecuațiile ma	tematice ale ex	presiei liniare	ale modelului
--------------	----------------	-----------------	-----------------	---------------

izotermei de adsorbție Langmuir [137]		izotermei	de	adsorbție	Langmuir	[137]	
---------------------------------------	--	-----------	----	-----------	----------	-------	--

Mai mult ca atât, constanta Langmuir poate fi utilizată în calculul unei constante adimensionale cunoscută ca factorul de separare, R_L . Această constantă a fost definită de Webber și Chakkravorti [138] și este exprimată prin ecuația matematică:

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_0}$$

 K_L este constanta Langmuir (L/mg);

 C_0 este concentrația inițială a adsorbatului (mg/L).

Constanta R_L este utilizată pentru evaluarea procesului de adsorbție. În acest context:

- pentru $R_L > 1$ procesul de adsorbție se va considera nefavorabil;
- pentru $R_L=1$ adsorbția este liniară;
- pentru valori ale factorului de separare $0 < R_L < 1$ procesul este favorabil;
- pentru $R_L = 0$ procesul este ireversibil.

Modelul izotermei de adsorbție Freundlich descrie adsorbția non-ideală și reversibilă, nerestricționată de formare a monostratului de molecule adsorbite pe suprafața adsorbantului. Modelul este utilizat pentru descrierea sorbției în sistemele eterogene ținând cont de interacțiunile moleculare dintre centrii activi precum și cele dintre moleculele adsorbatului. Acest model consideră, de asemenea, că centrii cu afinitate puternică sunt ocupați primii. Modelul izotermei de adsorbție Freundlich este exprimat prin expresia matematică exponențială:

$$q_e = K_f C_e^{1/n} \tag{2.4}$$

Forma liniară a ecuației izotermei de adsorbție Freundlich:

$$\log q_e = \log K_f + \frac{1}{n} \log C_e \tag{2.5}$$

 K_f este constanta empirică ce oferă informații despre capacitatea de adsorbție a biomasei celulare; *n* este constanta empirică ce indică intensitatea procesului de sorbție.

Valorile acestor constante sunt calculate din graficul $logq_e$ în funcție de $logC_e$ al ecuației liniare Freundlich. Valorile cuprinse între 0 și 1 ale $logK_f$ calculate din forma liniară a modelului Freundlich pot fi utilizate pentru a descrie intensitatea adsorbției sau eterogenitatea suprafeței: cu cât valoarea $logK_f$ se apropie de zero cu atât sistemul studiat este mai eterogen, iar pentru $logK_f$ mai mari decât 1 se consideră că are loc chemosorbția. Pe baza valorii constantei l/n procesele de sorbție pot fi clasificate ca:

- ireversibile dacă 1/n=0;
- dacă se obțin valori 0 < 1/n < 1, atunci se consideră procese favorabile;
- iar pentru valori ale 1/n>1 se consideră procese nefavorabile [137].

Modelul izotermei de adsorbție Dubinin-Radushkevich descrie mecanismul de adsorbție utilizând distribuția Gaussiană a energiei pe suprafețele eterogene. Modelul este aplicat pentru a

diferenția adsorbția fizică de adsorbția chimică a ionilor de metale și este descris de expresia matematică:

$$q_e = (q_s)exp(-k_{ads}\varepsilon^2) \tag{2.6}$$

Unde parametrul ε este constanta izotermei Dubinin-Radushkevich și poate fi obținut din relația:

$$\varepsilon = RT ln \left[1 + \frac{1}{C_e} \right] \tag{2.7}$$

R este constanta gazului (8,314 J/molK);

T este temperatura absolută (K);

 C_e este concentrația de echilibru a adsorbatului (mg/L).

Forma liniară a ecuației este redată prin expresia:

$$ln(q_e) = ln(q_s) - k_{ads}\varepsilon^2$$
(2.8)

 q_s este capacitatea de saturație a izotermei teoretice;

 k_{ads} este constanta izotermei Dubinin-Radushkevich.

Relația dintre constanta izotermei Dubinin-Radushkevich și energia liberă medie per mol de adsorbent este exprimată prin ecuația matematică:

$$E = \left[\frac{1}{\sqrt{2k_{ads}}}\right] \tag{2.9}$$

Valorile parametrilor q_s și k_{ads} sunt obținuți din graficul $ln(q_e)$ în funcție de ε^2 . În baza energiei libere de adsorbție, modelul Dubinin-Radushkevich permite identificarea tipului de sorbție ce are loc în sistemele modelate:

- adsorbţie fizică (1-8 kJ/mol);
- adsorbție prin schimb ionic (9-16 kJ/mol);
- adsorbție chimică (>16 kJ/mol) [137, 139].

Cultivarea biomasei Dunaliella salina

Biomasa *Dunaliellei salina CNM-AV-02* a fost cultivată în Laboratorul de Ficobiotehnologie al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei. Materialul originar a fost colectat din zona limanului Sasâc, situat pe teritoriul regiunii Odessa, de către echipa de cercetarea a domnului academician Valeriu Rudic [140].

Celulele au fost crescute în mediul lichid Ben-Amotz [141], timp de 14 zile, la temperatura de 25 °C și iluminare constantă. Componența mediului de cultivare standard este prezentată în Tabelul 2.2.

Componența	Cantitatea pentru 1 litru	Concentrația
NaCl	100 g	1,72 M
$MgSO_4$	0,60 g	5,00 mM
$CaCl_2$	0,03 g	0,30 mM
KNO ₃	0,50 g	5,00 mM
KH_2PO_4	0,003 g	0,40 M
FeCl ₃	0,00024 g	1,50 µM
EDTA	0,00223 g	6,00 µM
NaHCO ₃	4,20 g	50,0 mM
Soluția de microelemente	1 mL	-

Tabelul 2.2. Componența mediului de cultivare Ben-Amotz

Cantitatea de biomasă celulară a fost determinată spectrofotometric înainte de fiecare experiment prin măsurarea absorbanței suspensiei de celule la o lungime de undă specifică pentru tulpina *Dunaliellei salina* (λ =680 nm) [140] și ulterior convertirea valorii obținute în unități de masă uscată utilizând curba de calibrare obținută anterior prin metoda gravimetrică.

Reactivi

Reactivii utilizați în cadrul studiilor descrise în capitolul 2, erau de puritate analitică, procurați de la Sigma-Aldrich: citratul de fier (III) (BioReagent, pentru cultivarea biomasei celulare), clorura de sodiu (BioXtra 99,5 %), HEPES (puritate 99,5 %), ferocianura de potasiu (puritate >90,0 %). Soluțiile au fost preparate prin dizolvarea reactivilor în apă deionizată și ultrafiltrată (instalația HFSuper NW series).

Instrumente și aparate

Spectroscopia în domeniul ultraviolet și vizibil (UV-VIS) este una dintre cele mai utilizate metode fizice de studiu a structurii substanțelor. Această metodă are la bază fenomenul de absorbție a radiațiilor electromagnetice din domeniul ultraviolet (200 - 400 nm), vizibil (400 - 760 nm) și domeniul infraroșu foarte apropiat (760 - 1100 nm). Ca rezultat, are loc trecerea electronilor de pe orbitalii de legătură π , σ sau de antilegătură *n* de la o stare de energie mai joasă la o stare excitată. Datorită tranzițiilor electronice este înregistrat spectrul electronic ce oferă informații despre sistemele studiate [142]. Pentru studiile de sorbție microbiologică, măsurătorile în domeniul ultraviolet-vizibil au fost efectuate utilizând spectrofotometrul Perkin Elmer Lambda 25 din cadrul Institutului de Chimie al Academiei de Științe a Moldovei. Spectroscopia în domeniul infraroşu (IR) este o metodă fizică de analiză structurală, care se bazează pe fenomenul de absorbție a radiației electromagnetice din domeniul infraroşu de către molecule, având ca urmare schimbarea energiei vibraționale a legăturilor interatomice. Această metodă este utilizată pentru identificarea grupelor funcționale din structura compușilor chimici cercetați [142]. Mai recent, această metodă a fost aplicată pentru cercetarea sistemelor celulare și identificarea modificărilor biochimice produse în compoziția biomasei celulare [143]. Astfel, pentru identificarea modificărilor produse în rezultatul expunerii biomasei *Dunaliella salina* la mediul cu concentrație sporită de ioni de fier, eșantioanele de biomasă celulară uscată au fost analizate în domeniul infraroşu utilizând spectrometrul Perkin Elmer FTIR Spectrometer Spectrum 100 din cadrul Institutului de Chimie al Academiei de Științe a Moldovei. Spectrele în domeniul infraroşu au fost înregistrate în intervalul 4000-650 cm⁻¹. Descifrarea peak-urilor spectrelor înregistrate a fost efectuată conform datelor din literatura de specialitate [143] și [144].

Centrifugarea eșantioanelor de suspensie celulară s -a realizat utilizând centrifuga Hettich Micro200R în regimul de 13000 rpm timp de 5 min și temperatură de 23 °C.

Măsurătorile pH-ului în sistemele modelate au fost efectuate utilizând pH-metrul WTW inoLab Multi 720.

2.3. Efectul parametrilor de operare asupra procesului de sorbție microbiologică a ionilor de fier

Prima etapă a procesului de sorbție microbiologică a ionilor metalici poate fi atribuită reacțiilor de oxido-reducere și de schimb ionic dintre speciile organice sau anorganice ale metalelor și grupările funcționale de pe suprafața celulară. În unele cazuri, această etapă este urmată de depunerea ulterioară a speciilor ionice adsorbite și inițierea proceselor de nucleație ce rezultă în formarea unor nanostructuri anorganice la suprafața celulară, aproximativ până în 50 % din biomasa uscată.

Un factor important ce influențează procesul de sorbție microbiologică este speciația chimică, adică distribuția unui element sau compus dat între diferite forme specifice și configurații disponibile, care împreună constituie concentrația totală a acelui element sau compus în probă. O atenție specială necesită reacțiile de hidratare și hidroliză. Raportul mare dintre sarcină și dimensiunea cationului rezultă în creșterea energiei de hidratare ceea ce conduce la formarea ionilor hidratați:

$$M^{+} + nH_2O \rightarrow [M(H_2O)_n]^{+}$$
 (2.10)

Reacțiile de hidroliză se realizează atunci când aciditatea (raportul sarcină / dimensiune) a cationului este într-atât de mare, încât aceasta cauzează ruperea legăturii H-O și formarea ionului de hidroniu:

$$Fe^{3+} + 6H_2O \rightarrow [Fe(H_2O)_6]^{3+} \rightarrow H_3O^+ + [Fe(H_2O)_5OH]^{2+}$$
 (2.11)

Existența produșilor multinucleari ai reacțiilor de hidroliză este un fenomen general. Speciile hidrolizate se transformă în dimeri în urma procesului de condensare. Dimerii pot suferi reacții de hidroliză ce conduc la formarea unor concentrații adiționale de grupări hidroxo. Secvența ambelor reacții, de obicei, rezultă în formarea hidroxo-polimerilor coloidali și în cele din urmă formarea precipitatelor. Formarea complecșilor mononucleari și polinucleari sunt procese dependente de concentrație [103]. Reacțiile menționate modifică compoziția chimică a soluțiilor de ioni metalici în timpul "îmbătrânirii" lor. În acest context, am examinat raporturile existente între speciile chimice al fierului trivalent în soluția apoasă în funcție de valoarea pH-ului. Sistemele model create în cadrul studiilor de sorbție microbiologică sunt extrem de complexe, iar estimarea exactă a distribuției speciilor chimice ale ionilor de fier este dificil de obținut. O distribuție teoretică mai generală a speciilor ionilor de fier a fost obținută utilizând pachetul de programe Visual Minteq [145], prezentată în Figura 2.2.



Fig. 2.2. Distribuția teoretică a speciilor ionilor de fier, calculată pentru sisteme model de concentrație de citrat de fier (III) de 0,5 mM în 50 mM HEPES.

Reieşind din estimările teoretice pentru sistemele studiate în echilibrul termodinamic atins la pH-ul 8,0 am obținut următoarea distribuție a speciilor chimice ale ionilor de fier: 75,25% $Fe(OH)^{2+}$; 8,44% $Fe(OH)_4^-$ și 3,94% $Fe(OH)_3$. Studiile raportate în literatura de specialitate cu privire la speciația citratului de fier (III) la diferite valori ale pH-ului, arată că pentru concentrații mai mici de 0.1 mM de citrat de fier (III), la valori ale pH-ului mai mari de 7.5 nu are loc formarea hidroxo-polimerilor coloidali [146, 147].

Efectul timpului de contact

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. Concentrația biomasei celulare era de 0,35 g/L. pH-ul inițial al sistemelor cercetate a fost ajustat până la valoarea 8,0. Sorbția microbiologică a fost urmărită prin monitorizarea diminuării concentrației citratului de fier (III) în soluția din sistemele cercetate.

Cinetica procesului de sorbție a ionilor de fier de către celulele vii ale *Dunailellei salina* este prezentată în Figura 2.3.



Fig. 2.3. Cinetica procesului de sorbție a ionilor de fier de către celulele vii ale *Dunailellei salina*. Condiții: citrat de fier (III) – 0,5 mM în 50 mM HEPES; concentrația biomasei - 0,35 g/L; pH 8,0.

Reieşind 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 fier din mediul celular începe încet după primele 15 minute de contact și crește rapid

după 45 minute, ajungând la un echilibru termodinamic la 60 minute de timp de contact. O "întârziere" similară în evoluția procesului de sorbție microbiologică a ionilor de fier de către tulpina *Dunaliella salina* a fost observată de Paz ş.a. [133] în sistemele în care se conținea biomasă celulară cultivată în mediul nutritiv în care se conținea și fier. Aparent, această "întârziere" este indusă de prezența fierului acumulat din mediul nutritiv în care au fost cultivate microalgele și ar putea fi eliminată prin incubarea celulelor de microalge pentru 30-60 minute în mediu nutritiv deficitar de fier. Un alt factor ce influențează procesul de sorbție microbiologică în sistemele studiate ar putea fi speciația chimică a ionilor de fier. Pentru a testa aceasta posibilitate, s-a efectuat un studiu experimental în care a fost monitorizată fluctuația concentrației citratului de fier (III) de 0,5 mM în mediul de cultivarea al *Dunaliellei salina.* Rezultatele acestui studiu au indicat că în decursul a 2 ore ionii de fier din mediul de cultivare rămân accesibili pentru celulele microalgelor. Astfel, am presupus că această "întârziere" a procesului de sorbție microbiologică este asociată cu timpul necesar celulelor *Dunaliella salina* de a sintetiza liganzi responsabili de complexarea ionilor de fier din mediul extracelular, inclusiv proteine transportoare de cationi metalici.

Efectul cantității de biomasă

Efectul biomasei celulare vii asupra procesului de sorbție microbiologică a fost urmărit în sistemele în care s-a variat concentrația biomasei *Dunaliella salina*: 0,021; 0,084; 0,210și 0,378 g/L. Procesul a fost urmărit pentru concentrația citrat de fier (III) de 0,5 mM în sistemele modelate. pH-ul inițial al sistemelor cercetate a fost ajustat până la valoarea 8,0. După 45 minute de contact al biomasei celulare vii cu soluția de citrat de fier (III) de concentrație 0,5 mM în 50 mM HEPES a fost înregistrată concentrația remanentă a fierului trivalent în sistemele modelate. Reieșind din rezultatele obținute, a fost stabilit că procesul de sorbție se intensifică cu creșterea concentrației biomasei în sistem, după cum reiese din Figura 2.4.

Cantitatea de biomasă este un factor cheie în procesul de sorbție microbiologică a cationilor metalici. În literatura de specialitate sunt enumerate mai multe grupe funcționale disponibile pe suprafața celulei, ce sunt implicate direct în legarea ionilor metalelor din mediul extracelular. Creșterea cantității de biomasă celulară în sistemele modelate va spori numărul de grupări funcționale disponibile pentru legarea ionilor metalelor [96]. De asemenea, este necesar de menționat contribuția interacțiunilor electrostatice între celule, care poate influența procesul de sorbție. În rezultatul acestor interacțiuni electrostatice, sistemele ce conțin concentrații scăzute de biomasă celulară vor acumula cantități mai mari de ioni ai metalelor [148]. Contrar la ceea ce se menționează în literatura de specialitate, că sporirea concentrațiilor de biomasă celulară duce

la reducerea procesului de sorbție microbiologică, în acest studiu au fost obținute rezultate care indică că procesul de sorbție se intensifică cu creșterea concentrației biomasei. Acest comportament poate fi explicat prin faptul că în sistemele studiate interacțiunile electrostatice sunt nesemnificative, astfel încât acestea nu influențează procesul de sorbție microbiologică a ionilor de fier.



Fig. 2.4. Efectul cantității de biomasă celulară vie *Dunailellei salina* asupra procesului de sorbție a ionilor de fier. Condiții: citrat de fier (III) – 0,5 mM în 50 mM HEPES; concentrația biomasei: 0,021; 0,084; 0,210și 0,378 g/L; pH 8,0; timp de contact – 45 min.

Efectul valorii pH-ului inițial

Un factor important ce ar trebui luat în considerație în studiile procesului de sorbție microbiologică este valoarea pH-ului inițial al soluțiilor din sistemele modelate, întrucât acesta determină speciația chimică a cationilor metalici și disponibilitatea grupelor funcționale de pe suprafața celulară. În acest sens, a fost examinat efectul valorii pH-ului inițial al soluțiilor asupra procesului de sorbție microbiologică a ionilor de fier de către celulele vii ale *Dunaliellei salina*. Astfel, au fost modelate sisteme în care am variat pH-ul inițial al soluțiilor, menținând constanți ceilalți parametri. Volumul soluției, concentrația biomasei celulare și concentrația inițială a citratului de fier (III) erau de 10 mL, 0,35 g/L și 0,5 mM, respectiv. După 45 minute de contact al biomasei celulare vii cu soluția de citrat de fier (III) de concentrație 0,5 mM în 50 mM HEPES a fost înregistrată concentrația remanentă a fierului trivalent în sistemele modelate. Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 2.5. Sorbția maximă a fost înregistrată la pH 8,0.

S-a constat că valoarea pH-ului influențează direct valoarea sarcinii totale a suprafeței celulare precum și disponibilitatea grupelor funcționale de pe suprafața celulară. Creșterea pH-ului soluției conduce la deprotonarea grupărilor funcționale disponibile pe suprafața celulară, intensificând procesul de sorbție microbiologică [149].



Fig. 2.5. Efectul valorii pH-ului asupra procesului de sorbție a ionilor de fier
de către celulele vii ale *Dunailellei salina*. Condiții: citrat de fier (III) – 0,5 mM în 50 mM
HEPES; concentrația biomasei – 0,35 g/L; timp de contact – 45 min.

În cazul tulpinii *Dunaliella salina*, procesul de sorbție microbiologică a ionilor de fier se realizează prin intermediul proteinei din familia transferinelor. Reacția dintre molecula proteică a transferinelor și ionii de fier este dependentă de pH-ul mediului de reacție. În literatura de specialitate se menționează că pH-ul din intervalul 7,5 - 9,5 va favoriza legarea fierului de moleculele proteice de transferină, pe când valorile scăzute al pH-ului vor conduce la disocierea parțială sau completă a complexului proteic [150]. Intensificarea procesului de sorbție microbiologică a fierului la valori ridicate ale pH-ului în sistemele modelate ar putea fi atribuite activității proteinei de tip transferină, produsă de celulele tulpinii *Dunaliellei salina*.

Efectul concentrației inițiale de fier

Procesul de sorbție microbiologică este influențat de concentrația inițială a ionilor metalici în soluție. Pentru a evalua efectul concentrației inițiale a fierului în mediul de reacție au fost modelate sisteme în care s-a variat concentrația citratului de fier (III) de 0,3; 0,5; 0,75; 1,25 și 2,5 mM în 50 mM HEPES, menținând constanți ceilalți parametri. Volumul soluției,

concentrația biomasei celulare și pH-ul inițial al mediului erau de 10 mL, 0,35 g/L și 8,0, respectiv. Concentrația remanentă a fierului trivalent în sistemele modelate a fost înregistrată după 45 minute de contact al biomasei celulare vii cu soluția de citrat de fier (III).

S-a identificat că pentru intervalul de concentrații analizat și timp de contact de 45 minute, sorbția microbiologică a fierului este dependentă de concentrația inițială a fierului în sistemele modelate. Odată cu creșterea concentrației inițiale a fierului în sistem procesul de sorbție se intensifică (Figura 2.6).



Fig. 2.6. Efectul concentrației inițiale a citratului de fier (III) asupra procesului de sorbție microbiologică. Condiții: C₀(C₆H₅FeO₇) – 0,3÷2,5 mM în 50 mM HEPES; concentrația biomasei - 0,35 g/L; pH 8.0; timpul de contact – 45 min.

Dependențe similare ale sorbției microbiologice de concentrația inițială a cationilor metalici au fost raportate în literatura de specialitate. Astfel, fenomenul intensificării procesului de sorbție microbiologică la creșterea concentrației cationilor metalici în sistemele modelate a fost explicat prin creșterea probabilității coliziunii ionilor metalici de suprafața celulelor microorganismelor [151].

Efectul altor factori operaționali

Prezența ionilor de hidrogenocarbonat în sistem

Microalga verde *Dunaliella salina* se deosebește de alte culturi de alge prin procesul specific de sorbție a ionilor de fier. Specificitatea procesului constă în producerea unei proteine de tip transferină pentru legarea fierului din mediul extracelular și transportarea acestuia în interiorul celulei. Producerea acestei proteine este un fenomen unic în lumea vegetală.

Transferinele sunt o familie de proteine responsabile de legarea fierului din mediu și transportarea acestuia. Fiecare moleculă proteică de transferină poate lega doi atomi de Fe(III). Reacția de complexare a ionilor de Fe(III) decurge cu participarea ionilor de carbonat / hidrogenocarbonat. Astfel, dacă sorbția fierului din mediu decurge cu participarea proteinei de tip transferină, atunci sorbția va fi influențată de prezența ionilor de hidrogenocarbonat în mediu.

Pentru a examina efectul prezenței ionilor de hidrogenocarbonat am modelat două sisteme 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. Concentrația biomasei celulare era de aproximativ 0,35 g/L. pH-ul inițial al sistemelor cercetate a fost ajustat până la valoarea 8,0. Sistemele modelate diferențiau doar prin faptul că un sistem a fost suplimentat cu ioni de hidrogenocarbonat în concentrație de 5 mM. Dependențele înregistrate sunt redate în Figura 2.7.



Fig. 2.7. Cinetica procesului de sorbție a ionilor de fier (1) - în absența ionilor de HCO₃⁻ și (2) - în prezența ionilor de HCO₃⁻ în concentrație de 5 mM.

Condiții: citrat de fier (III) – 0,5 mM în 50 mM HEPES; concentrația biomasei – 0,35 g/L.

Rezultatele obținute indică clar asupra efectului prezenței ionilor de hidrogenocarbonat în sistemele modelate. Deși pentru primele 15 minute de contact se păstrează "întârzierea" în evoluția procesului de sorbție microbiologică a ionilor de fier de către tulpina *Dunaliella salina*, prezența ionilor de hidrogenocarbonat intensifică procesul.

Efectul salinității mediului de cultivare

Tulpina microalgei *Dunaliella salina* este bine cunoscută pentru rezistența sa la mediul cu salinitate sporită (până la 5,5 M NaCl). Ca răspuns primar la șocul osmotic produs de

hipersalinitatea mediului, celulele *Dunaliellei salina* produc cantități sporite de glicerol pentru a regla presiunea osmotică internă. Însă, producerea glicerolului nu este suficientă pentru a explica toleranța *Dunaliellei salina*. Celulele acestei microalge apelează la mecanisme suplimentare care contribuie la sporirea toleranței la condițiile hipersaline. Unele mecanisme au fost identificate, o parte din ele fiind legată de producerea unor proteine [152]. De asemenea, s-a identificat că în condiții de salinitate substanțial ridicată este amplificată și producerea proteinei de tip transferină, responsabilă de legarea fierului din mediu. Prin urmare, se presupune că celulele cultivate în mediul cu salinitate sporită vor produce cantități mai mari de proteină de tip transferină și ca urmare se va intensifica procesul de sorbție microbiologică a ionilor de fier. În baza datelor științifice, raportate în literatura de specialitate, se poate postula că sporirea salinității mediului conduce în mod indirect la intensificare procesului de sorbție a fierului de către celulele *Dunaliellei salina*.

Pentru a examina efectului salinității mediului de cultivare, celulele Dunaliellei salina au fost cultivate în două serii, în paralel. Mediul de cultivare pentru ambele serii era de compoziția mediului standard Ben-Amotz, cu diferență doar în concentrația sării de NaCl în mediu, în prima serie aceasta constituia 0,5 M, iar în a doua serie era de 1,72 M. Celulele au fost cultivate timp de 14 zile, la temperatura de 25 °C și iluminare constantă. În continuare, acestea au fost utilizate pentru modelarea sistemelor. Pentru cercetarea procesului de sorbție microbiologică suspensia de biomasă celulară a fost dispersată în soluție de citrat de fier (III) de concentrație 0,5 mM în 50 mM HEPES. Concentrația biomasei celulare era de aproximativ 0,35 g/L. pH-ul inițial al sistemelor studiate a fost ajustat până la valoarea 8,0. Efectul salinității mediului de cultivare asupra procesului de sorbție a ionilor de fier de către biomasa celulară este prezentată în Figura 2.8. Din rezultatele obținute, s-a constatat o sorbție sporită a ionilor de fier, în sistemele modelate în care se conținea suspensia biomasei celulare vii cultivate în condiții de salinitate redusă. Întrucât în literatură se specifică că în condiții de salinitate scăzută celulele vii ale Dunaliellei salina se caracterizează printr-o productivitate scăzută, fenomenul identificat în sistemele modelate poate fi asociat cu dezvoltarea unei biomase celulare străine în mediul de cultivare. Prezența ionilor de fier în mediul de cultivare a celulelor

În literatura de specialitate se menționează că implicarea proteinei de tip transferină în procesul de legare a ionilor de fier din mediu este condiționată de absența fierului în mediul de cultivare [152]. Astfel, celulele *Dunaliellei salina* cultivate în mediul deficitar de fier vor dezvolta capacitatea de a sintetiza proteina de tip transferină, responsabilă pentru legarea fierului din mediu, ca urmare, aceste celule vor fi capabile să acumuleze mai mult fier din mediu. Reieșind din această constatare a fost cercetat efectul prezenței fierului în mediul de cultivare al

Dunaliellei salina asupra procesului de sorbție a ionilor de fier. Astfel, în sistemele modelate cu celule crescute în mediu deficitar de fier a fost înregistrată adsorbția de 26,14 mgFe/g (*t*=45 min) și 44, 68 (*t*=60 min), iar în sistemele celule crescute în mediu cu ioni de fier a fost înregistrată adsorbția de 24,14 mgFe/g (*t*=45 min) și 42, 68 (*t*=60 min). Lipsa fierului în mediul de cultivare al celulelor conduce în mod indirect la intensificarea sorbției fierului.



Fig. 2.8. Cinetica procesului de sorbție a ionilor de fier de către celulele vii ale Dunailellei salina. Efectul salinității mediului de cultivare a fost cercetat pentru concentrații de: (1) 0,5 M NaCl și (2) 1,72 M NaCl. Condiții: citrat de fier (III) – 0,5 mM în 50 mM HEPES; concentrația biomasei – 0,35 g/L.

2.4. Descrierea procesului de sorbție microbiologică a ionilor de fier

Modelele izotermelor de adsorbție Langmuir, Freundlich și Dubinin-Radushkevich au fost aplicate pentru descrierea procesului de sorbție microbiologică a ionilor de fier. În baza datelor obținute experimental au fost estimați parametrii izotermelor Langmuir, Freundlich și Dubinin-Radushkevich utilizând modele liniare și nelineare de regresie. Datele experimentale au fost comparate cu cele obținute folosind modelele acestor izoterme.

Analiza regresiei liniare

Analiza regresiei liniare a fost efectuată utilizând opțiunea Solver Excel al pachetului de programe Microsft Office. Această opțiune permite estimarea optimizată a valorilor pentru panta liniei de regresie și punctul de origine al dreptei, utilizați în recalcularea parametrilor izotermelor de sorbție. Modelul izotermei Langmuir poate fi liniarizat în patru tipuri diferite de regresii liniare (Tabelul 2.1). Dintre cele patru forme liniare Langmuir de Tip 1 și Tip 2 sunt cel mai

frecvent aplicate întrucât devierea ecuației liniare obținute este mai mică comparativ cu formele liniare Langmuir Tip 3 și Tip 4. În cadrul acestei etape au fost utilizate cele patru tipuri ale ecuației liniarizate ale modelului Langmuir pentru fitarea datelor experimentale. Parametrii obținuți în rezultatul analizei regresiei liniare pentru formele linearizate ale izotermelor de adsorbție împreună cu coeficienții de corelare R^2 sunt indicați în Tabelul 2.3.

Izoterma	Parametrii	Valorile	
	<i>b</i> (<i>L/mg</i>)	0,008	
nuir 1	$Q_0(mg/g)$	32,787	
angr Tip	$\overline{R_L}$	0,6594	
Γ	R^2	0,8664	
	<i>b</i> (<i>L/mg</i>)	0,0155	
nuir 2	$Q_0(mg/g)$	22,024	
angr Tip	$\overline{R_L}$	0,5193	
Γ	R^2	0,9323	
	<i>b</i> (<i>L/mg</i>)	0,013	
nuir 3	$Q_0(mg/g)$	24,821	
angr Tip	$\overline{R_L}$	0,557	
Π	R^2	0,6893	
	<i>b</i> (<i>L/mg</i>)	0,009	
nuir 4	$Q_0(mg/g)$	31,11	
angı Tip	$\overline{R_L}$	0,635	
Π	R^2	0,6893	
	$K_f(mg/g)$	0,7802	
ndli	n	1,5940	
Freu	R^2	0,9802	
	$q_s (mg/g)$	13,870	
nin- kevia	E (kJ/mol)	70,060	
Dubi. Radush	R^2	0,7016	
	L		

Tabelul 2.3. Parametrii obținuți din forma liniară a izotermelor de adsorbție

Se constată faptul, că valorile constantelor Langmuir variază în dependență de tipul de model aplicat. Comparând valorile coeficienților de corelare (R^2) în cazul celor patru tipuri de ecuații lineare Langmuir, putem evidenția că forma de Tip 2 descrie mai bine distribuția datelor experimentale. Prin fitarea datelor experimentale cu ecuația liniară a modelului Freundlich s-a obținut un coeficient de corelare mai mare decât în cazul modelelor Langmuir, R^2 fiind de 0,9802. Modelul izotermei Dubinin-Radushkevich a fost aplicat pentru estimarea energiei libere (E) în sistemele modelate, E = 70,06 kJ/mol.

În baza parametrilor obținuți prin analiza regresiei liniare au fost construite izotermele de adsorbție Langmuir, Freundlich și Dubinin-Radushkevich prezentate în Figura 2.9.



Fig. 2.9. Izotermele de adsorbție a ionilor de fier (III) de tulpina *Dunaliellei salina* construite după modelul regresiei liniare.

După cum se vede din Figura 2.9, forma liniară a modelului Freundlich descrie cel mai bine procesul de sorbție microbiologică a ionior de fier de către microalga verde *Dunaliella salina* în intervalul de concentrații 0,3 – 2,5 mM citrat de fier (III).

Studiul de față prezintă eficacitatea aplicării analizei regresiei liniare pentru determinarea modelului izotermei de adsorbție ce descrie cel mai bine sistemele cercetate.

Reieşind din analiza comparativă a valorilor R^2 calculate din regresia liniară a datelor obținute pentru sistemele modelate *Dunaliella salina* în contact cu soluții de concentrații ale citratului de fier (III) variind în intervalul 0,3 – 2,5 mM, menționăm că dintre cele șase forme liniarizate ale modelelor izotermelor aplicate, forma linearizată Freundlich descrie cel mai bine

procesul de sorbție microbiologică, urmată de forma liniarizată Langmuir de Tip 2. Diferența pronunțată în valorile parametrilor izotermelor de adsorbție (Tabelul 2.3) indică asupra complexității estimării acestora utilizând tehnicile de linearizare. Această observație indică faptul că tehnicile de liniarizare nu sunt suficiente pentru prezicerea mecanismului de sorbție microbiologică. Diferența dintre datele experimentale și modelele liniare ale izotermelor obținute (Figura 2.9) se poate datora și problemei transformării expresiei neliniare în ecuații liniare mărind marja de eroare în estimările teoretice. Mai mult, expresiile liniare nu pot fi utilizate în cazul în care datele experimentale au formă neliniară. Astfel, în continuare datele experimentale au fost analizate prin regresia neliniară.

Analiza de regresie neliniară

Această etapă a fost efectuată utilizând opțiunea Solver Excel al pachetului de programe Microsft Office. Analiza de regresie neliniară a fost aplicată pentru estimarea parametrilor izotermelor de adsorbție Langmuir, Freundlich și Dubinin-Radushkevich, rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2.4.

Izoterma	Parametrii	Valorile	
	<i>b</i> (<i>L/mg</i>)	0,006	
nuir	$Q_0(mg/g)$	39,2781	
angr	$\overline{R_L}$	0,7169	
Γ	R^2	0,9715	
ch	K_f	0,6040	
mdli	n	1,4571	
Freu	R^2	0,9881	
ch	q_s	16,3243	
binin- shkev	E (kJ/mol)	56,8803	
Du Radu	R^2	0,7397	

Tabelul 2.4. Parametrii obținuți din ecuațiile neliniare ale izotermelor de adsorbție

Reieşind din rezultatele obținute (Tabelul 2.4) se observă că analiza de regresie neliniară pentru cele patru expresii liniare Langmuir rezultă în aceleași valori ale parametrilor. În baza parametrilor obținuți au fost construite izotermele de adsorbție Langmuir, Freundlich și Dubinin-Radushkevic.

Din Figura 2.10 se poate observa că prin metoda de regresie neliniară, modelele Langmuir și Freundlich descriu mai bine procesul de sorbție urmărit în sistemele modelate. Analiza comparativă a valorilor parametrilor obținuți pentru fiecare model de izoterme și a coeficienților de corelare indică asupra faptului că modelul Freundlich descrie cel mai bine sorbția microbiologică a ionilor de fier de către tulpina *Dunaliellei salina* în intervalul de concentrații ale citratului de fier (III) 0,3 – 2,5 mM, având un coeficient de corelare (R²) de 0,9881. Valoarea mică a coeficientului de corelare R²=0,7297 a modelului Dubinin-Radushkevich demonstrează că sorbția în sistemele cercetate nu este în concordanță cu teoria acestei izoterme de sorbție. Însă, valoarea energiei libere de adsorbție estimată din modelul acestei izoterme, E=56,88 kJ/mol, conduce la concluzia că în sistemele studiate au loc procese de adsorbție chimică. Această constatare susține ideea că ionii de fier sunt legați chimic din mediul extracelular de către structuri chimice precum proteina de tip transferină produsă de biomasa vie a *Dunaliellei salina*.



Fig. 2.10. Izotermele de adsorbție a ionilor de fier (III) de tulpina *Dunaliellei salina* construite după modelul regresiei neliniare.

Valoarea calculată a factorului de separare R_L este de 0,7169, ceea ce conduce la concluzia că procesul de sorbție microbiologică este favorabil pe întreg domeniul de concentrații utilizat în acest studiu. Această constatare este susținută și de valoarea constantei 1/n de 0,6863 calculată din modelul izotermei Freundlich. Valorile relativ mici ale constantelor de sorbție obținute din izotermele de adsorbție (Tabelul 2.4) în comparație cu cele specificate în literatura

de specialitate pentru biomasa uscată a *Dunaliellei salina* [153] sugerează existența unui mecanism combinat de biosorbție și bioacumulare ce conduce la îmbogățirea cu fier a mediului intracelular.

2.5. Analiza spectrală a biomasei Dunaliella salina în domeniul IR

Spectroscopia în infraroșu cu transformata Fourier (FTIR) este utilizată la scară largă ca o metodă rapidă și directă pentru cercetarea subiectelor biologice și identificarea modificărilor biochimice produse în compoziția acestora [153]. Această tehnică oferă informații valoroase despre legăturile chimice și permite identificarea grupelor funcționale active de pe suprafața celulară. Spectrele înregistrate pentru eșantioanele de biomasă celulară reprezintă "amprenta" materialului biologic studiat. Analiza formei și intensității peak-urilor de absorbție FTIR oferă informații despre grupele funcționale specifice precum și structura moleculară. Această informație este utilizată pentru diferențierea anumitor procese biochimice ce au loc în celulele studiate.

Spectrele FTIR înregistrate pentru eșantionul de biomasă uscată fără fier și eșantionul de biomasă uscată ce a contactat cu fierul sunt prezentate în Figura 2.11. Datele selectate din spectrele FTIR înregistrate sunt prezentate în Tabelul 2.5.



Fig. 2.11. Spectrele FTIR înregistrate pentru biomasa uscată a *Dunailellei salina*,(a) fără fier și (b) îmbogățită cu fier.

Compararea celor două spectre arată că majoritatea variațiilor intensității peak-urilor au fost înregistrate în regiunea spectrală 3500-3200 cm⁻¹ desemnate pentru grupa OH legată și vibrația de întindere NH. Prezența peak-urilor în această regiune a numerelor de undă confirmă prezența grupelor hidroxil și amino în structura biomasei *Dunaliella salina*.

	Numere de	undă (cm ⁻¹)	Grupele functionale	
Vibrații	(a)	(b)	_ Grupele funcționale	
	D. salina	D. salina+Fe	şi compuşi	
Grupa OH legat; vibrația de	3280	3329	apa, proteine	
întindere NH			[143,144]	
Întindere asimetrică CH ₂	2925	2927, 3007	Gruparea metilenică	
			CH2 [144]	
Întindere asimetrică CH ₂ și CH ₃	-	2856	Gruparea metil sau	
			metilinică [144]	
Vibrația de întindere C=O	1724	1743	Esterii lipidelor sau a	
			acizilor grași [144]	
Vibrația de întindere C=O	1643	1591	Proteine (amide	
			primare) [144]	
NH deformare simetrică,	-	1545	Proteine (amide	
CH întindere simetrică			secundare) [144]	
Vibrații asimetrice de curbare	1446	1456	Gruparea metil sau	
ale CH ₂ și CH ₃			metilinică [144]	
S=O de întindere	1404	1379, 1356	Sulfonații [143]	
Curbarea CH	1283	1281	Izopropil (lipide)	
			[143]	
P=O curbare asimetrică	1242	1231	Fosfolipide [143]	
C-O-C și C-O de întindere	1150-1075	1100-939	Polizaharide [144]	
P-C de întindere	750, 718, 707,	764, 722	Posfonați [143]	
	672			

Tabelul 2.5.	Compararea	frecvențelor	de vibrație	din spectrele	IR ale	biomasei	Dunaliellei	salina

Adițional, au fost înregistrate modificări ale intensității peak-urilor pentru numerele de undă ale aminelor primare și secundare ale proteinelor. Aceste observații conduc la concluzia ca aceste grupe funcționale sunt implicate în legarea fierului din mediu prin intermediul reacțiilor de complexare ale proteinelor produse de tulpina *Dunaliellei salina* [131].

Mai mult, peak-urile caracteristice polizaharidelor suferă și ele modificări, deplasându-se spre numere de undă mai mici, de la 1150 - 1075 cm⁻¹ spre 1100 - 939 cm⁻¹. *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]. Deplasarea spre numere de undă mai mici, înregistrată în spectrele obținute, sugerează deprotonarea grupelor funcționale –OH și participarea acestora în legarea fierului prin intermediul reacțiilor de schimb ionic (Figura 2.12).



Fig. 2.12. Reprezentarea schematică a reacției de schimb ionic dintre molecula de polizaharidă și ionii de Fe³⁺. Polizaharida sintetizată de tulpina *Dunaliella salina* este constituită din monomeri de acetil glucozamina [154].

2.6. Concluzii la capitolul 2

Cercetările efectuate în cadrul acestui capitol au permis stabilirea condițiilor optime pentru realizarea procesului de acumulare a ionilor de fier și formare a structurilor de dimensiuni nanometrice în celulele vii ale microalgei verzi *Dunailellei salina*.

Astfel, în profilul evoluției în timp, al procesului de sorbție a ionilor de fier de către celulele vii ale *Dunailellei salina*, a fost evidențiată o întârziere de 15 minute, iar timpul de contact optim pentru a asigura o sorbție eficientă a fost stabilit la 45 minute.

Creșterea cantității de biomasă celulară vie în sistemele modelate va conduce la sporirea procesului de acumulare a ionilor de Fe(III).

De asemenea, pentru a obține o adsorbție maximă a ionilor de Fe(III) de către biomasa celulară vie a *Dunaliellei salina* a fost stabilit pH-ul optim la valoarea 8,0.

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.

Prezența ionilor de hidrogenocarbonat intensifică procesul de sorbție. Această constatare susține ideea că procesul de sorbție microbiologică a ionilor de fier de către celulele vii ale *Dunaliellei salina* are la bază reacția de complexare a ionilor de fier de către moleculele proteice de tip transferină.

Studierea prezenței fierului în mediul de cultivare a celulelor a condus la concluzia că insuficiența fierului în mediul de cultivare al celulelor conduce în mod indirect la intensificarea sorbției fierului.

Procesul de sorbție ionilor de fier de către celulele vii ale *Dunaliellei salina* este bine descris de modelul izotermei Freundlich ($R^2=0,9881$). 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.

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.

Procedeul de examinare a tulpinii *Dunaliella salina* descris în cadrul acestui capitol poate fi utilizat în calitate de protocol de cercetare pentru testarea microorganismelor pentru identificarea capabilității de producere a nanoparticulelor.

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

Sinteza microbiologică este o metodă eficientă de producere a nanoparticulelor cu morfologie controlată pentru aplicații bio-medicale [156]. 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 fața de ionii metalelor prezenți în mediul celular, iar procesele metabolice implicate diferă și ele între speciile microorganismelor. Entitățile biologice produc cantități mari de proteine responsabile de reducerea ionilor metalici și legarea acestora în mediul extracelular [157]. Studierea mecanismului interacțiunii structurilor proteice cu ionii de fier va contribui la înțelegerea și optimizarea procesului de sinteză microbiologică a nanoparticulelor de fier.

3.1. Transferinele

Proteinele sunt substanțe organice macromoleculare formate din lanțuri de aminoacizi, ele sunt prezente în celulele tuturor organismelor vii și reprezintă aproximativ 50 % din greutatea celulară uscată. Structural, proteinele sunt considerate polimeri ai aminoacizilor. Chiar dacă există o mare diversitate a tipurilor de proteine cu diferite funcții biologice, lanțul polipeptidic al proteinelor este constituit numai din 20 de L- α aminoacizi a căror structură este bine cunoscută. Secvența aminoacizilor în structura fiecărei proteine este unică, fiind codificată de o genă.

Din punct de vedere chimic, proteinele sunt organizate în lanțuri polipeptidice primare. Lanțurile polipeptidice se formează în rezultatul policondensării aminoacizilor, aceștia fiind legați prin legăturile peptidice ale combinațiilor de grupări carboxilice și grupărilor amino ale aminoacizilor. Aranjarea structurală a aminoacizilor în lanțul polipeptidic este influențată de anumite interacțiuni intramoleculare ce definesc structura secundară a proteinei. Structura secundară a proteinei reprezintă conformația proteinei în mediul natural, fiind indusă de legăturile de hidrogen dintre resturile de aminoacizi din lanțul polipeptidic. Cele mai întâlnite tipuri de structură secundară sunt α -helixul și structurile β -pliate. Structura α -helix reprezintă o structură în formă de spirală ce se datorează legăturilor de hidrogen între unitățile peptidice. Acest tip de structură secundară oferă porozitate și mobilitate conformației proteice. Structura secundară de tip foaie β -pliată este formată din legăturile de hidrogen dintre lanțurile polipeptidice învecinate. Acest tip de structură secundară conferă rigiditate conformației proteice [158]. Chimia proteinelor este destul de complexă și presupune înțelegerea principiilor de formare a moleculelor proteice precum și organizarea structurală a acestora. Astfel, pentru studierea proteinei de interes este important de stabilit o abordare separată specifică în care să se țină cont de construcția chimică, arhitectura precum și funcția biologică pe care aceasta o exercită.

Transferinele sunt familia de proteine responsabile de legarea ionilor de fier din mediu. Printre membrii acestei familii de proteine se numără: transferina serică, lactoferina, ovotransferina și melanotransferina. Rolul esențial al transferinelor este fixarea ionilor de fier din mediul extracelular și transportul acestora în interiorul celulelor.

Transferinele sunt glicoproteine cu masa moleculară în jur de 80 kDa, compuse dintr-un singur lanț polipeptidic de regulă pliat în doi lobi similari. Lanțul polipeptidic este construit din aproximativ 600-700 aminoacizi, numărul acestora variind în funcție de specie. O altă trăsătură caracteristică membrilor acestei familii de proteine este centrul activ al proteinei, acesta fiind constituit din patru aminoacizi implicați direct în legarea ionului de fier (III). Sfera de coordinare a ionului de fier din molecula proteică este completată de ionul de carbonat ce acționează în calitate de punte între transferină și ionul de fier. Transportul fierului spre celule se realizează prin legarea a două molecule de transferină diferică de receptorul homodimeric specific de pe suprafața celulară (Figura 3.1). Astfel, prin endocitoza mediată de receptor, fierul este eliberat rapid din structura transferinelor și depozitat în endozom [159].



 Fig. 3.1. Reprezentarea grafică a hetero-tetramerului AABB format din receptorul homodimeric (AA) și două molecule de transferine (BB).
 Modelul este reconstruit din fișierul de structura 3S9L.pdb.

Spre deosebire de ceilalți membri ai familiei de transferine, lactoferina este responsabilă doar de legarea ionilor de fier din mediu. De asemenea, mecanismul de legare a fierului, în cazul lactoferinei, este unul diferit. Întrucât, în literatura de specialitate a fost descris mecanismul de legare a fierului de molecule de transferina serică, ovotransferina, melanotransferina și mai puțin este cunoscut mecanismul specific lactoferinei, în continuare a fost cercetată molecula de lactoferină.

3.2. Lactoferina

Lactoferina este o glicoproteină monomer cu masa moleculară în jur de 80 kDa, responsabilă pentru legarea ionilor de Fe(III) din fluidele fiziologice. Această proteină a fost izolată pentru prima data din laptele bovin [160], iar cercetările ulterioare au arătat că lactoferina prezintă o afinitate înaltă față de ionii de fier. Mai târziu această proteină a fost recunoscută ca membru al familiei transferinelor, adică a proteinelor capabile să lege și să transfere ionii de Fe(III) [161]. Lactoferina a fost identificată în secrețiile glandelor exocrine precum și plasma sangvină. Principala sursă de lactoferină plasmatică sunt granulațiile specifice neutrofilelor [162, 163]. Deși lactoferina a fost clasificată ca o glicoproteină cu o afinitate înaltă față de ionii de fier trivalent, studiile au arătat că același centru activ al proteinei este capabil de a lega și ioni ai altor metale. Astfel, s-a ajuns la concluzia că centrul activ al proteinei dispune de o flexibilitate suficientă pentru a modifica numărul de coordinare [164].

Lactoferina constă dintr-un singur lanț polipeptidic alcătuit din 600-700 aminoacizi organizați în structuri de tip α -helix și foaie β -pliată [165]. Lanțul polipeptidic al lactoferinei este pliat în doi lobi elipsoidali (N și C) conectați printr-un helix (Figura 3.2.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 3.2.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 3.2.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 și lactoferina diferică (hololactoferina). Specificitatea procesului de legare a ionilor de Fe(III) se datorează participării ionilor de carbonat. Anionul trebuie să fie fixat în centrul activ al proteinei pentru a asigura legarea ionilor de Fe(III). Tabelul 3.1 prezintă dimensiunea legăturilor chimice dintre ionii de fier și liganzii din sfera de coordinare. Datele au fost obținute din analiza fișierului de structură al lactoferinei umane (1B0L.pdb) determinată experimental cu ajutorul difracției de raze-X.



Fig. 3.2. Reprezentarea grafică a: (A) lactoferinei monoferice (1LHF.pdb);(B) lactoferinei diferice (1B0L.pdb); (C) sferei de coordinare a ionului de fier (III) în lobul N al lactoferinei de către reziduurile aminoacizilor.

Legătura	lobul N	lobul C
Fe-O:Asp60 (Asp395)	2,146	2,008
Fe-O:Tyr92 (Tyr435)	2,035	2,004
Fe-O:Tyr192 (Tyr 528)	1,817	1,848
Fe-N:His253 (His597)	2,087	2,194
Fe-O1:CO ₃ ²⁻ 695(CO ₃ ²⁻ 696)	2,007	2,286
Fe-O2:CO ₃ ²⁻ 695(CO ₃ ²⁻ 696)	2,138	2,010

Tabelul 3.1. Dimensiunea legăturilor chimice (Å) ale ionilor de Fe(III) coordinați la liganzii din centrii activi ai lactoferinei umane

Reacția de legare a ionilor de Fe(III) este reversibilă și dependentă de pH-ul mediului, lobul N al proteinei eliberează fierul la pH 5,0, iar lobul C reține fierul până la pH 3,5 [166]. Studiile experimentale au arătat că molecula de lactoferină își schimbă conformația în timpul reacției. Astfel, hololactoferina va adopta conformația închisă, pe când apolactoferina va avea conformația deschisă.

Lactoferina posedă numeroase funcții biologice. Proprietățile biochimice ale lactoferinei derivă din caracteristicile structurale ale acesteia precum și din funcția de bază de legare a ionilor de fier. Lactoferina este implicată în mai multe procese fiziologice inclusiv antimicrobiene [167], imunomodulatoare [168] și anticancerigene [169, 170]. Datorită acestui 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.

Obiectivul principal al acestui studiu este de a determina proprietățile specifice ale lactoferinei, care determină interacțiunea acesteia cu ionii de Fe(III) prin aplicarea tehnicilor computaționale și experimentale. Obiectivul propus se realizează prin elaborarea unui protocol de cercetare pentru studierea structurilor moleculare biologice, care combină o serie de metode de analiză și caracterizare structurală a lactoferinei.

3.3. Metodologia de cercetare a structurii și mecanismului de interacțiune a lactoferinei cu ionii de Fe(III)

De-a lungul ultimilor decenii, diverse metode au fost propuse pentru a studia structura și dinamica proteinelor. Metodele utilizate la momentul actual de către comunitatea științifică pot fi

clasificate în tehnici experimentale de spectroscopie și tehnicile computaționale. În cadrul acestei etape, metodele computaționale au fost utilizate pentru evaluarea secvențelor proteice de lactoferină disponibile în bazele de date pentru proteine, iar pentru caracterizarea structurală a lactoferinei în soluții au fost alese spectroscopia UV-VIS, FT-IR și SAXS. În continuare vor fi descrise metodele computaționale utilizate.

Tehnici computaționale aplicate

În prezent sunt disponibile în băncile de date pentru proteine structuri moleculare ale lactoferinelor izolate din diferite specii. În acest context, analiza acestor structuri în ideea de a evalua gradul de similitudine / omologie reprezintă o etapă importantă de realizat.

În continuare au fost selectate cinci fișiere de structură ale lactoferinei izolate de la diferite specii animale, codul PDB al acestor fișiere este prezentat în Tabelul 3.2.

Codul PDB	Descrierea	Referința
1B0L	Lactoferina diferică umană	[171]
1BIY	Lactoferina diferică de bivol	[172]
1BLF	Lactoferina diferică bovină	[173]
1I6B	Lactoferina diferică cabalină	[174]
116Q	Lactoferina diferică de cămilă	[175]

Tabelul 3.2. Codul PDB al fișierelor de structură folosite

Grafica moleculară este una din tehnicile esențiale pentru modelarea proteică, care are la bază analiza structurilor proteice 3D, manipularea în 3D, precum și compararea diferitelor conformații moleculare. Pachetul de programe de grafică moleculară utilizat în cadrul acestei etape este VMD (Visual Molecular Dynamics) [176].

Metoda de *aliniere multiplă al secvențelor* (Multiple Sequence Alignment) este un instrument informatic de modelare proteică bazat pe analiza gradului de omologie. Această metodă este utilizată pentru evaluarea seturilor de secvențe și structuri macromoleculare biologice ce au o relație de evoluție comună. Folosirea combinată a informației oferită de secvențe și a instrumentelor de calcul va conduce la creșterea înțelegerii funcției proteinelor cu structură similară. Protocolul de cercetare standard pentru realizarea studiului de *aliniere* multiplă cuprinde următoarele etape:

- 1. identificarea secvenței proteice de interes;
- 2. găsirea omologilor cu structura cunoscută pentru proteina cercetată;

- 3. *alinierea* secvențelor proteice;
- 4. calculul setului de parametri pentru *alinierea multiplă*;
- 5. evaluarea calității alinierii și identificarea similitudinii sau diferențelor dintre proteinele.

Fișierele ce conțin informația de structură ale lactoferinelor au fost preluate din *Banca de Date pentru Proteine* (Protein Data Bank [177], PDB). Banca de Date pentru Proteine este o bază de date ce conține informația de structură 3D, de rezoluție înaltă, ale moleculelor biologice, ale căror structură a fost descifrată prin metode de difracție de raze-X și RMN. Fișierele cu informații de structură de rezoluție înaltă ale moleculelor biochimice sunt în format PDB.

Studiul de *aliniere multiplă* a moleculelor de lactoferină a fost realizat cu pachetul de programe MultiSeq [178]. Acest program permite evaluarea secvențelor și structurilor moleculelor proteice și acizilor nucleici. Pentru *alinierea de secvență* a lactoferinelor cercetate a fost utilizat *plugin*-ul ClustalW [179]. Pentru *alinierea de structură* a lactoferinelor cercetate a fost utilizat *plugin*-ul STAMP [180]. Rularea algoritmilor incluși în *plugin*-urile STAMP și ClustalW rezultă în generarea unui set de parametri: Q_{res} (similitudinea structurală per reziduu), Q_H (omologia structurală per reziduu), identitatea procentuală, RMSD (devierea medie pătratică). Valorile acestor parametri diferă în dependență de algoritmul aplicat pe același set de proteine. Prin urmare, acest set de parametri poate fi folosit pentru evaluarea calității *alinierii* și pentru identificarea similitudinii sau diferenței dintre proteinele cercetate.

Calculele constantelor de aciditate (pKa) ale resturilor de aminoacizi din structura proteinei au fost realizate cu H++ web server [181-183]. Metoda care stă la baza acestor determinări a fost descrisă de Bashford D. și Karplus M. [184] și aceasta constă în calcularea valorilor constantelor de aiciditate, pentru grupele ionizabile ale aminoacizilor din structura proteică prin aplicarea modelului electrostatic continuu Poisson-Boltzmann [185, 186]. Determinările *pKa* au fost realizate în condiții de tărie ionică 150 mM, constanta dielectrică a proteinei 4,0 și constanta dielectrică a solventului 80,0. Structurile PDB au fost protonate corespunzător mediului fiziologic de pH 7,4 utilizând câmpul de forțe AMBER [187].

Calculele potențialului electrostatic pe suprafață au fost efectuate cu pachetul de programe APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*) [188]. Protocolul de calcul al potențialului electrostatic de suprafață include procedura de adăugare a atomilor de hidrogen polari la structura 3D a proteinei aplicând un câmp de forțe, în studiul de față a fost utilizat câmpul de forțe PARSE [189]. Calculele potențialului electrostatic pe suprafață au fost realizate în condiții de temperatură de 298,15 K, tărie ionică 150 mM, constanta dielectrică a proteinei 1,0 și constanta dielectrică a solventului 78,0. Ceilalți parametri au fost setați automatic de pachetul de programe APBS.
Tehnici experimentale aplicate

Reactivi - În cadrul acestui studiu a fost utilizată lactoferina diferică umană procurată de la Sigma-Aldrich. Pentru masurătorile de împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X, probele de lactoferină diferică umană au fost tratate cu ditiotretiol (DTT) (de puritate BioUltra). DTT este un agent reducător puternic, utilizat pentru protejarea probelor biologice de radiație. DTT a fost procurat de la Sigma-Aldrich. Soluțiile au fost preparate prin dizolvarea reactivilor în apă deionizată și ultrafiltrată (instalația HFSuper NWseries).

Instrumente și aparate - Metoda de împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X (*Small Angle X-ray Scattering*, SAXS) este o tehnică fundamentală de analiză a structurii materiei condensate, ce oferă informații despre dimensiunea, forma și structura internă a materiei cercetate. Metoda SAXS este utilizată cu succes în domenii de cercetare precum fizica materiei condensate, biologia moleculară, biofizică, ș.a. Această metodă are la bază fenomenul de interacțiune a razelor-X de lungimi de undă mici (0,1 - 0,2 nm) cu materia. Comparativ cu difracția de raze-X, SAXS nu permite identificarea structurii atomice a materialelor.

În timpul unei măsurători SAXS fascicolul monocromatic incident este direcționat spre eșantionul ce conține soluția cu particule coloidale sau macromolecule. În rezultatul interacțiunii fascicolului de raze-X cu eșantionul analizat are loc împrăștierea elastică a razelor-X la unghiuri mici față de fascicolul de raze incidente. În metoda împrăștierii la unghiuri mici se măsoară intensitatea fascicolului împrăștiat de raze-X și este determinată ca funcție a unghiului de împrăștiere 2θ , care este proporțional cu vectorului de împrăștiere q, definit ca diferența dintre vectorul incident (k_i) și vectorul de împrăștiere (k_s) $q = k_s - k_i$, prezentat în Figura 3.3.



Fig. 3.3. Definirea vectorului de împrăștiere q ca diferența dintre vectorul de incidență k_i și vectorul de împrăștiere k_s .

Acest fenomen are la bază împrăștierea elastică a radiației electromagnetice de către particule de dimensiuni mult mai mici sau de dimensiuni de același ordinul cu fotonul care interacționează cu particula. Vectorului de împrăștiere este exprimat prin formula:

$$q = 4\pi \sin \theta / \lambda \tag{3.1}$$

 2θ este unghiul de împrăștiere;

 λ este lungimea de undă a fluxului incident de raze-X.

Intensitatea de împrăștiere este produsul dintre factorul de formă P(q) și factorul de structură S(q):

$$I(q) = \frac{N}{V} P(q) S(q)$$
(3.2)

Factorul de formă oferă informații despre forma și dimensiunea particulelor sau macromoleculelor cercetate, iar factorul de structură despre interacțiunea dintre particule [190]. Analiza probelor de lactoferină a fost realizată la spectrometrul SAXS. Măsurătorile au fost efectuate la fascicolul de radiație X33 al inelului de accelerare Doris, la sincrotronul DESY (Deutsches Elektronen-Synchrotron) din Hamburg, Germania, un institut național în care acceleratorul de particule este utilizat pentru cercetarea structurii materiei. Curbele experimentale obținute au fost analizate folosind programele incluse în pachetul ATSAS [191].

Spectroscopia în domeniul UV-VIS este utilizată în studiul proprietăților fizico-chimice ale proteinelor în soluții. În literatura de specialitate se specifică că proteinele au un maxim de absorbție în intervalul de lungimi de undă 240 - 300 nm, care se datorează în mare parte absorbanței aminoacizilor aromatici triptofan, tirozina și fenilalanină. Legăturile disulfidice dintre două cisteine au un maxim de absorbție la 260 nm. Absorbanța aminoacizilor triptofan, tirozina și fenilalanină depinde de micromediul cromoforilor acestora, astfel încât fiind expuși la solvent acești aminoacizi vor avea spectrul puțin deplasat cu aproximativ 5 %. Grupele peptide ale lanțului proteic absorb și ele, însă în domeniul ultraviolet îndepărtat (180-230 nm). Mai mulți co-factori ai proteinelor absorb în domeniul UV-VIS [192]. Spectroscopia în domeniul ultraviolet și vizibil a fost utilizată pentru confirmarea prezenței ionilor de fier (III) în structura lactoferinei în soluție. Măsurătorile în domeniul ultraviolet-vizibil au fost în cadrul Laboratorului de Fizică a Neutronului, Institutul Unificat pentru Cercetări Nucleare, Dubna, Federația Rusă.

Spectroscopia în domeniul infraroșu (IR) este o tehnică implementată cu succes pentru cercetarea structurilor proteice și a mecanismelor biochimice [193]. Probele au fost analizate în domeniul infraroșu utilizând spectrometrul Perkin Elmer FTIR Spectrometer Spectrum 100 din cadrul Institului de Chimie al Academiei de Științe a Moldovei. Spectrele în domeniul infraroșu au fost înregistrate în intervalul 4000-650 cm⁻¹.

3.4. Studiu de aliniere multiplă a moleculelor de lactoferină

Reprezentarea *alinierii multiple* de secvență a lactoferinei umană, bivolină, bovină, cabalină și de cămilă, colorată după similitudinea secvențelor este redată în Figura 3.4.

Sequence Name	1		ji p	5 <u>1</u> 5	10.1	61 - 162 -	10	.0	22 B	12	10 - 10	10.1	8 <u>8</u> 9	.20	2.52	12.1	2.12	10 10	10.1	.30	2 - 22	10 10	10 P	10.1	10 - 10	.40	a 40	12.1	2 32	8 18	10 - 10	.50
1BOL	LC	F R	R	RS	v	0 0	ı c	τν	5 () P	E.	A T	К	F	0 1	0	RN	M		VR	GP	P V	5	I	KF	R D	S P	Г	0 C	1 0	A I	A
	I A	P	R	KN	v	RW		T I	5 0	Q P	EV	V L		н	RW	Q	WR	M	K	LG	AP	SI	T	c v	RF	R A	FV	L	EC	IR	AI	Т
	5	1		, N	V	RV		T I	5 0	2 P	E \	VF		R	RM	Q	WR	M	K	LG	A P	S I	Т	C V	RF	R A	FA	L	EC	IR	A I	A
		A P	R	KS	V	RW			5 1	A	E	AA		A	K F	Q Q	RN	M	K	VR	GP	SV	S T		RK	T	SS	F	EC	I Q	AI	A
Sequence Name	Ľ			15			6	0					1.5	70			14 14			.80					5 15	.90		0.5 0.5				100
VMD Protein Structures				39.	19. 39. 		9. 39.	- 10 - 11		30 30 				30 30. -		97 99. 			397 397. Maria	- do - do			<u>b. (b.</u>					39. 39 				
1BOL 51	E	N	R						GF	Ι	YE	A	GL	A				PN	A	ΑE	VY	GT	EF	R Q	PR	T S	HY			AV	VK	
	E	K	K	A D			LE		GM	V	FE	A	GL	D	PY			PN	A /	A E	IV	GT	KE	S	PQ	2 1	HY			AV	VK	
	E A	N	K						G	v			GR	Н	P Y P V					A E		OT	RC	K			P V				V	
116Q 71 51	T	E	K						GL	v	YD	A	GL	D				PI	A	AE	v v	GT	EN	Q	PQ	T	HY			AI	AK	
Sequence Name				4		- 4	. 1	10			- 4			120						130	1		4.4	4		140	1	4.5				15
VMD Protein Structures													-				-								PPUGP					-		
180L 101	0	G	S	FQ		NE	1		LK	S e				R	RI	A	GW	N		I G			F		WV	G	P F		P 1	E A	A	
	G	ŝ	N	FO			1		RK	, S		 + т		G	RS	Ā	GW	T	P	M G	1		Ý	5	w	T F	5 1	-	PI	0 0	Â	
116B . 101	G	s	G	FQ	L	NQ	L	ò G	VK	s				G	RS	A		N	P	IG	TL		Y	LN	w	T G	PF	E	PL	QK	A	
116Q 🔽 1 101	G	Т	N	FQ	L	NQ	L	Q G	LK	s	C F	I T	GL	G	RS	A	G W	N :	P	MG	LL	RF	F	L D	w	T G	PF	E	PL	QK	A	V A
VMD Protoin Structuror	+			<u></u>	<u>.</u> .		10	50			- 34		-	1/0	- 1					180						190	- 1	<u>i i</u>				200
	R	E	E (s A	s	τv	P (Ξ Δ	D K	G	O F	P	NI	e l	R II	c		TC	E I	I K	C A	ES	5	E	PY	E	< V	5	G A	E K	C 1	R
□1BIY	K	F		S A			P	c v	DR	Q	A	P		c	QL	c	KG	EG	EI	Q		CS	PF	E		F	GY					Q
□1BLF 🔽 151	K	F					P	C I	DR	Q	A	P		c	QL	C	KG	EG	E	Q		C S	SF	2 E		F	GY					Q
116B V 1151	N	F					P	A	DG	K	Q	P		. с	R L	C	AG	ΤE	AE	ОК		C S	S C	2 E		ſF	GY					E
Sequence Name	K	F	F	S A	S	C V	P 2		DG	5 K.	E	P	NL	220	QL	C	AG	TC	EI	220	C A	CS	SC	5	ΡY	240	GY	S	GA	FK	C L	Q 250
VMD Protein Structures	+			-		-								220			-			250	-					240				-		20
□1B0L	D	G	A	GD	V	A F	I	RE	SI	v	FE	D	LS	D	EA	E	R D	E	E	L	C P	DN	T	K	P V	/ D	KF	K	DC	HL	AF	2 V
1BIY 201	D	G					VI	K E	TI			Ν	LP	E	KA	D		Q			CL	NN	T	RA	P V	/ D	A F	K	EC		AC	2 V
1BLF 201	D	G					VI	K E	TI		FE	Ν	LP	E	KA	D		Q			CL	NN	S	RA	P V		AF	K	EC		AC	2 V
201 1160	N	G		GD			VI	D	5		FE	N	L P	D	EA	E	R D	K			P	DN	T	K	PV	D	AF	K	EC		AF	
Sequence Name	U	9	A	9 0		AF	20	50	2	V		2		270	~		K U	Y I		280	SP	DI IN		K.	IF V	290	AU	V.				300
VMD Protein Structures									_								_															
160L 251	P		H	A V		A R	S	N	GK	E	DA	1	WN	L	LR	Q	AQ	EK	FC	K	DK	S P	KF	Q	LF	G	S P	S	GQ	K D		
1BIY 251	P							D	GK	E	DL	1	W K	L	LS	K		EK	FC	K	NK	SG	SI				SP	P	G Q	RD		
116B 251	P							D	GK	E	D		K		LS	K.		EF	FC	D K		SK	5				SP	P	GQ	K D		
116Q VII 251	P							N	GK	E	DI	i,	wk	L	L V	K		EK	FC	R	GK	PS	A				SP	A	GO	KD		
Sequence Name	1						3	10						320	1					330	Pactor I					340						350
VMD Protein Structures		97 - 97		-	_					01 - 07				01 - 01											-			1 - 11 1 - 11				
1BOL 301	K			A I	G	FS	R	V P	PF	1 S		G			GS	G	YF	TA	IC	2 N		ΚS	EE	E	VA	A	RR	А	RV			
1BIY 301	K			AL	G	FL	R	I P	SK	V		A			GS	R	YL	I A	LI	N		ET	A	E	VQ	A	RR	A	RV			
116B 301	K				9	FV	R	I P	SC			G			GA	R	Y L		T			EI	A	E	VA	A	RR	F	RV			
116Q 301	ĸ			AL	G	LL	R	IP	KK	I		G	LY		GS	N	YI	TA	IF	R G		ET	AA	E	VE	L	RR	A	QV			
Sequence Name							. 3	60					-	370						380						390						400
VMD Protein Structures			0		n.	N 15		0					c 10	1 -	<i>c c</i>		A 6							. r	E (1.0			6 V.
	6	P	F	EC	K		0		5 0	0 0	5	5 0	J I		CA	T			D									S			Y I	i v
18LF 351	G	P	E	EQ	K		Q	Q W	5 0	QQ	5	5 Q	N	T	CA	T			D	D C	IV	LV					AL	N			YI	Y
116B	G	P	E	EE	R		K	Q W	S	V	SI	R	KA	A	CA	S			E	EC	I A	LV					AL	N			F 1	Y
□116Q 😽 🖬 351	G	s	D	EQ	1	КС	Q	EW	S F	R Q	5 1	I Q	S	/ V	CA	T	A S	TI	E	DC	I A	LV	LI	KG	E 4	A D	AL	S	LD	GG	Y 1	Y
Sequence Name	-						4.	10					-	420						430						440				- 4		450
1BOL VID FIOLENI Structures	т	A	G	ĸс	G	ιv	P	V L	AE	N	Y	s	0.0	5	S D	Р	D P	N	v	DB	PV	EG	Y	A	V A	A V	VR	R	S D	TS	1.5	r w
1BIY 1 401	T	A								N	R	s	SK	H	S S	L	D.		v	R	PT	EG					VK	K	AN	E G	L	
1BLF 7 1 401	T	А								N	R I	(S	S K	н	S S	L	D.	<u> </u>	v	L R	P T	EG					V K	К	ΑN	E G	LI	
116B V z i 401	V	A		кс					AE	N	QI	S	QN	S	NA	P	D.		V	R	P P	EG					VR	K	S D	A D	L	W
Sequence Name	1	A	G	КС	G	LV	P	V L	AL	2	QC	2 5	PE	470	5 6				_ V	480	PV	KC	1 1 1	LA	V A	400	VR	K	AN	DK	1 1	500
VMD Protein Structures	+		<u> </u>		• •	10			<u> </u>	27 22		<u> </u>	-	410	155 1		155-15	• •		400	1231-12		• •	2 ¹ 2 ¹	-	750	125. 12	•	1	152 15	<u> </u>	200
1BOL 92 1 451	N	I S	V	K G	K	κs	С	ΗT	A	D	R	Γ A	GV	V N	I P	M	GL	L F	N	Q T	G S	СК	F	D E	YF	= s	QS	С	A P	GS	D F	R
18IY . 449	N		L	KG	K				A	D		r a	GV		I P		GL	I A	N	QT	GS	C A	FI	D E	FF					G A	DF	К
			L	K D	V K				A	D	R		GV	V N			GL	1 \	N	2 1	GS	C A	FL	E	F					GA	DF	K
116Q 7 1 449	N		L	RG	ĸ				A	D	R	T A	GV				G P	LF	К	Т	DS	CR	FI	E	FE					GS	DF	R
Sequence Name	I						. 5	10						520						530						540						550
VMD Protein Structures			-				-									-		No.	CHINA COLUMN				-			-		-				-
	S	N	L			C I	G	DE	QC	E	N	C	V		5 N	E	RY	YC							N A	G				K D	V	V
18LF 499	2	R	1	C A		C A	G		0		D	C C	V		SK	E	KY	Y C				RC			DI	G				KN	D	τv
□116B 	s	s	L			CV	G	NN	EN	E	N	¢¢	M		SE	E	RY	YC							KA	AG				K D	V	r v
116Q 🔽 1 499	8	K	L	C A	L	CA	G	NE	EC	Q Q	L	(C	VF	2 N	5 5	E	RL	YC	5 Y	TG	A F	RC	1	A E	N V	/ G	DV	(A	FV	K D	V	r v
Sequence Name							. 50	50						570					4.4	580						590			11.11	14.73		600
VMD Protein Structures		0	100100	T D		NI NI			100.00	12	D.		1.0		F A	1710	1.0				v 10		1.207		20							-
1BIY 711 549	W	/ E	N	TN	G	ES	T	A D	W A		N	N	RE	D	FR	1		D	G	R	K P	v T	EA	0			A	V				
18LF 549	W	/ E	N	TN	G	E S	T	A D			N	N	RE	D	FR	L		LD	G	R		VT	E A	Q			LA	V				
116B 7 1 549	L	Q	N	T D	G	KN	SI	ΕP			D	K	QE	D	FE	L		LD	G	R		VA	E /	E			LA	R				
U116Q 7 1 549	L	D	N	Ť D	G	KG	TI	E Q	W A	K K	D	K	LG	D	F E	L	LC	LN	G	R	ΚP	VT	Ε /	E	S C	H	L P	V	AP	NH	A V	V
VMD Protein Structures				-		1	61	.0						620	3			-		050		-			-	040						<u>p50</u>
	s	R	M		V	ER	1.4	0	V I	1	H G	0	AK	F.	G R	N.	2 5	DC	P D	K	C	1.5	0 5	F	TK	N	1 1	F.I	I D	N T	EC	1
□1BIY 599	s	L	SI	ER	A	AH	VE	Y O		L	HO	Q	AL	F	GE	NO	K	NC	PD	K			KS	E								L
1BLF 👽 1 599	s	R	SE	DR	A	A H	VB	Q		L	HQ	Q	A L	FO	G K	N	G K	NE	PD	KI			KS	E								L
116B T 1 599	s	Q	SC	DR	A	QH	LK	K		F	LQ	Q	DQ	FO	GG	NO	G P	DC	PG	KI			KS	E								L
Sequence Name	S	R	1	K	V	A H	L F		V L	L	RQ	0	A H	570	s R	N	s E	DC	P G	580	C	LF	QS	K	K	90	L	FI	D	NT	ΕC	l
VMD Protein Structures	1						00	× .						010											. 0	50	1					
1BOL 51	A	R	L F	G	K	ТТ	YE	K	Y L	G	PQ	YV	A	GI	T	NL	K	K C	S T	S P	L	E	A C	EF	L	RK						
1BIY 649	A	K	LO	G	RI	T	YE	Ε		G	ΤE	YV	T	AI	A	NL	K	K C	ST					A F	L	TR						
1168 V 1168	A	K	LO	G	RI	PT	YE	E		G	TE	YV	T	AI	A	NL	KI	KC	ST	SP				AF	L	TR						
116Q 7 649	A	K		2 6	K ·	TT	YD	E		G	PO	YV	T	A	A	K	R	RC	ST	SP				A		MR						

Fig. 3.4. Reprezentarea grafică rezultată din *alinierea multiplă* a secvențelor lactoferinelor cercetate. Aminoacizii variabili sunt marcați cu alb [194].

Compararea secvențelor proteice de lactoferină izolate de la patru specii animale (Tabelul 3.2) s-a realizat cu scopul de a evalua similitudinea acestor secvențe proteice disponibile în baza de date pentru proteine cu la lactoferina umană. Figura 3.5. reprezintă imaginea grafică rezultată în urma *alinierii multiple* ale celor cinci secvențe de lactoferină. Porțiunile colorate în negru, în reprezentarea grafică, indică faptul că moleculele sunt bine conservate în aceste puncte. Porțiunile colorate în gri sunt regiunile în care nu există o similitudine în structura moleculelor proteice.



Fig. 3.5. Reprezentarea grafică rezultată din *alinierea multiplă* după similitudinii structurale per reziduu (Q_{res}), a lactoferinelor cercetate.

Parametrii *alinierii de structură* și *secvență*, omologia structurală per reziduu (Q_H), identitatea procentuală, devierea medie pătratică (RMSD) pentru cele patru lactoferine cercetate sunt prezentați în Tabelele 3.3 și 3.4. Lactoferina umană a fost utilizată ca moleculă de referință.

	Lactoferina	Lactoferina	Lactoferina	Lactoferina
	de bivol	bovină	cabalină	de cămilă
Q _H	0,8393	0,8160	0,8688	0,3869
RMSD (Å)	1,5354	1,8106	1,2773	1,6093
identitatea procentuală (%)	69,35	68,88	74,31	30,60

Tabelul 3.3. Prametrii alinierii de structură [194]

	Lactoferina	Lactoferina	Lactoferina	Lactoferina
	de bivol	bovină	cabalină	de cămilă
Q _H	0,8356	0,8154	0,8634	0,4503
RMSD (Å)	1,6093	1,8616	1,1414	12,6343
identitatea procentuală (%)	70,19	69,61	74,96	73,81

Tabelul 3.4. Prametrii alinierii de secvență [194]

Parametrii calculați din *alinierea de structură* arată că, în general structura lactoferinei umane este bine conservată printre speciile cercetate în acest studiu. În cazul lactoferinei de cămilă, valoarea parametrului de omologie structurală 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).

Figura 3.6 prezintă graficul similitudinii structurale per reziduu (Q_{res}) al lactoferinei umane și lactoferinei de cămilă. Chiar dacă valorile Q_{res} diferă între cele două specii, forma graficelor este similară în ambele, cazuri indincând un profil strucural comun.



Fig. 3.6. Graficul similitudinii structurale per reziduu (Q_{res}) obținut pentru lactoferina umană (negru) și lactoferina de cămilă (gri) [194].

Rezultatele obținute evidențiază faptul că în ansamblu structura lactoferinei umane nu a suferit modificări de-a lungul evoluției în speciile cercetate în acest studiu. Deși gradul de similitudine al lactoferinei de cămilă este mai mic comparativ cu celelalte specii (identitatea procentuală fiind doar de 30,60 %), profilul structural al acestei proteine este similar cu cel al lactoferinei umane (Figura 3.6). Luând în considerare rezultatele obținute, în continuare, lactoferina umană a fost selectată ca obiect de studiu, întrucât s-a evidențiat că aceasta este cea mai reprezentativă dintre cele cinci structuri cercetate [194].

3.5. Validarea fișierului de structură al lactoferinei diferice umane

Evaluarea modelului de rezoluție înaltă propus de Banca de Date pentru Proteine și validarea acestuia este un studiu important de realizat. Structurile proteice sunt determinate experimental prin tehnici de difracție de raze-X sau prin spectroscopie cu rezonanță magnetică nucleară (RMN) de rezoluție înaltă. Aceste tehnici oferă informații despre poziția atomilor în moleculă. Spre deosebire de RMN, difracția de raze-X nu oferă informații cu privire la poziția atomilor de hidrogen în structura moleculară. Produsul final al unei măsurători de difracție de raze-X este harta densității electronilor atomilor din structură din care, cu ajutorul unor proceduri de calcul incluse în pachete de programe cu destinația specifică, se obțin pozițiile atomilor. Produsul final al unei determinări RMN este setul de distanțe între nucleele atomilor din interiorul moleculei. O altă deosebire dintre cele două tehnici este faptul că difracția de raze-X se realizează pe monocristalul de proteină, pe când RMN-ul măsoară proteina în soluție. Reieșind din cele expuse mai sus, ambele tehnici de determinare a structură mai puțin corect.

Validarea fișierului de structură a lactoferinei diferice umane preluat din Banca de Date pentru Proteine, 1B0L.pdb, a fost realizată prin spectroscopia UV-VIS și împrăștierea la unghiuri mici cu raze-X, SAXS.

Confirmarea prezenței ionilor de Fe(III) prin spectroscopia UV-VIS

Soluția apoasă de lactoferină este incoloră, însă în prezența ionilor de Fe(III) aceasta capătă o culoare roșietică asociată cu formarea complexului Fe(III)-lactoferină. Colorația este vizibilă doar pentru soluțiile concentrate ale lactoferinei ferice.

Pentru a verifica prezența fierului în soluția de lactoferină diferică umană preparată pentru măsurătorile de împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X am înregistrat spectrul lactoferinei în regiunea UV-VIS (Figura 3.7). Spectrul înregistrat prezintă peak-ul tipic complexului Fe-transferină înregistrat la lungimea de undă 280 nm, care confirmă prezența fierului în structura lactoferinei [192].



Fig. 3.7. Spectrul UV-VIS al soluției apoase a complexului Fe(III)-lactoferină, de 0,2%.

Împrăștierea la unghiuri mici cu raze-X, SAXS

SAXS este o metodă complementară ce permite studiul proteinelor în soluție cu ajutorul razelor-X. În urma măsurătorilor SAXS se obțin fișiere de structură de rezoluție joasă, însă prin suprapunerea acestora cu modelele de rezoluție înaltă putem evalua calitatea modelului de rezoluție înaltă [190]. Astfel, pentru validarea modelului de rezoluție înaltă al lactoferinei umane, 1B0L.pdb, au fost efectuate o serie de măsurători SAXS ale probelor de lactoferină diferică umană în soluție apoasă pentru a identifica condițiile optime de realizare corectă a experimentului. Curba de împrăștiere obținută este prezentată în Figura 3.8.



Fig. 3.8. Curba de împrăștiere SAXS obținută pentru complexul Fe(III)-lactoferină.

Prima etapă în interpretarea datelor SAXS constă în aplicarea unor funcții standard. Astfel, din curba de împrăștiere a fost calculată raza de girație, (R_G) în intervalul q de 0,034 – 0,096 Å⁻¹ utilizând aproximația Guinier:

$$I(q) = I(0)\exp[(-q^2 R_G^2/3)]$$
(3.3)

O valoare de R_G =41,7±0,5 Å pentru raza de girație a lactoferinei umane a fost obținută, independent de factorul de formă. Pentru a determina valoarea mai exactă a razei de girație, din curba de împrăștiere s-a calculat funcția de distribuție folosind programul GNOM din pachetul de programe ATSAS. Funcția de distribuție descrie distribuția distanțelor dintre perechile de particule într-un volum cunoscut. Programul GNOM calculează funcția de distribuție a particulelor prin transformata Fourier indirectă:

$$p(r) = \frac{r}{2\pi^2} \int_0^\infty q I(q) \sin(qr) dq$$
(3.4)

Parametrul *r* este distanța dintre două particule. Raza de girație este calculată din funcția de distribuție p(r) folosind formula:

$$R_G^2 = \int_0^{D_{max}} r^2 p(r) dr / \int_0^{D_{max}} p(r) dr$$
(3.5)

Parametrul D_{max} este distanța maximă în interiorul particulei. Raza de girație obținută în valoare de 42,0±0,4 Å este apropiată de valoarea obținută din aproximația Guinier. De asemenea, din funcția de distribuție a fost calculată distanța maximă, D_{max} =142,4±10 Å. Pentru a obține informații despre factorul de formă al macromoleculei de lactoferină, în continuare am aplicat funcția Kratky, în care se construiește graficul produsului $I(q)q^2$ în funcție de q (Figura 3.9). Funcția Kratky este utilizată pentru evaluarea stării particulelor / macromoleculelor în soluții. Graficul Kratky obținut din curba de împrăștiere a indicat că lactoferina în soluția apoasă analizată nu este în stare monomerică. De aceea, în continuare datele au fost modelate utilizând programul SASREF din pachetul de programe ATSAS.



Fig. 3.9. Graficul Kratky rezultat din curba de împrăștiere SAXS a complexului Fe(III)-lactoferină.

Programele SASREF și DAMAVER din pachetul de programe ATSAS au fost utilizate pentru procedurile de fitare a datelor experimentale și reconstrucția modelului 3D de rezoluție joasă a lactoferinei cercetate. Figura 3.10 prezintă procedura de fitare și modelul 3D obținut. Procedurile de fitare repetate ale datelor experimentale au condus la obținerea unui model al homodimerului de lactoferină. La suprapunerea modelului homodimerului de rezoluție înaltă al lactoferinei cu modelul de rezoluție joasă obținut din procedurile de fitare a datelor experimentale, se observă că cele două corespund.



Fig. 3.10. Modelarea homodimerului de rezoluție înaltă al lactoferinei: (A) procedura de fitare a curbei SAXS; (B) modelul 3D al homodimerului obținut.

Proteinele în soluție se comportă diferit, iar conformația pe care o adoptă în soluție poate să difere de cea din forma cristalină. Pentru o reproducere mai bună a rezultatelor obținute, trebuie respectate mai multe condiții. În cazul acestui studiu este necesar de creat un mediu pentru proteina cercetată astfel ca aceasta să existe în stare monomerică în soluția apoasă. Deși dovezile experimentale obținute din măsurătorile SAXS indică asupra faptului că lactoferina umană cercetată se auto-asociază în soluții apoase, rezultând în structuri homodimerice, rezultatele obținute ne-au permis să validăm modelul de rezoluție înaltă oferit de Banca de Date pentru Proteine. Astfel, fișierul de structură 1B0L.pdb al lactoferinei umane a fost utilizat în continuare în studiile computaționale.

3.6. Studiul constantelor de aciditate ale resturilor de aminoacizi din structura lactoferinei

Procesul de legare și eliberare a ionilor de fier de către molecula lactoferinei este precedat de modificări ale conformației moleculare. Datorită interacțiunilor intermoleculare, tranziția proteinei de la forma deschisă la forma închisă duce la modificarea stării de protonare a reziduurilor din compoziția proteinei. Pentru cercetarea proceselor de protonare-deprotonare a reziduurilor lactoferinei și identificarea aminoacizilor implicați direct în legarea și eliberarea ionilor de fier a fost aplicat modelul electrostatic continuu Poisson-Boltzmann pentru molecula de lactoferină în conformația deschisă și lactoferină în conformația închisă, în starea de protonare corespunzătoare unui pH fiziologic. Datele au fost colectate pentru lobul N în patru conformații ale lactoferinei: apolactoferina umană în conformația închisă. Tabelul 3.5 prezintă valorile *pKa* calculate pentru lactoferina umană în cele patru conformații. Rezultatele obținute confirmă că tranziția lacoferinei de la o conformație la alta este însoțită de schimbări în starea de protonare a unor reziduuri proteice specifice.

Acidul aspartic Asp-60 are valori pKa scăzute în toate conformațiile închise. Reieșind din informația de structură din fișierul PDB, Asp-60 formează o legătură de hidrogen cu lizina din poziția 301 a lanțului polipeptidic (Lys-301) în conformația deschisă; în conformația închisă această legătură este absentă, ceea ce explică această diferență a valorilor pKa.

La un pH fiziologic, tirozina este în stare deprotonată în toate pozițiile secvenței proteice, ce se află în conformațiile închise, cu excepția tirozinei Tyr-92 ce are o stare de protonare stabilă în toate patru conformații și Tyr-192 care este protonată în toate conformațiile închise. Această observație indică asupra importanței stării de protonare a reziduului de tirozină Tyr-192. Protonarea acestuia în forma închisă va declanșa eliberarea ionilor de fier.

Histidina, His-253 are valori scăzute în toate patru conformații ale lactoferinei. În formele închise ale lactoferinei valorile pKa se micșorează cu 4 pK unități. Închiderea lobului lactoferinei creează un mediu de interacțiuni electrostatice cu aminoacizii din proximitatea histidinei cauzând deprotonarea acesteia.

Valorile pKa ale lizinei Lys-301 suferă modificări în timpul tranzițiilor de la forma deschisă la forma închisă a lactoferinei. Deprotonarea lizinei este cauzată de aminoacizii din proximitatea acesteia.

Arginina, Arg-89, Arg-133, Arg-171, Arg-258, are valori ale pKa ridicate în forma deschisă și scăzute în formele închise ale lactoferinei. În schimb, arginina Arg-121 și Arg-210 suferă modificări ale valorilor pKa cu 4 pK unități, subliniind importanța participării resturilor aminoacidului din cele două poziții în procesul de închidere / deschidere al proteinei.

		рК	ľa	
Aminoacizi	a	b	С	d
GLU-51	6,973	5,318	5,296	5,293
*ASP-60	3,154	-0,405	-0,055	0,020
TYR-65	14,139	12,972	12,986	12,977
TYR-72	12,500	11,444	11,436	11,434
GLU-80	3,016	4,147	3,967	3,980
ARG-89	11,040	9,989	9,696	9,722
HIS-91	4,670	4,387	3,462	3,476
*TYR-92	12,218	12,034	12,615	12,857
ARG-121	8,169	3,781	3,781	3,667
ARG-133	16,499	11,879	11,946	11,936
LYS-163	9,867	7,833	7,826	7,815
ARG-171	14,304	11,913	11,908	11,908
*TYR-192	9,463	12,315	13,265	13,687
ARG-210	9,781	5,317	5,945	6,065
GLU-211	5,808	4,472	4,741	4,806
ARG-224	11,022	12,412	12,408	12,349
TYR-227	16,134	14,127	14,145	14,152
LYS-237	8,276	9,728	9,727	9,708
LYS-243	10,328	9,117	7,868	7,868
*HIS-253	2,371	-2,260	-1,762	-1,662
ARG-258	14,548	10,862	10,821	10,824
ASP-297	2,468	3,987	3,625	3,616
LYS-301	7,727	4,980	4,634	4,676
ASP-315	2,828	4,931	4,927	4,929

Tabelul 3.5. Valorile *pKa* calculate pentru lactoferina umană în diferite conformații [197]

a – pKa pentru apolactoferina umană în conformația dechisă;

b - pKa pentu hololactoferina umană;

c - pKa pentru hololactoferina fără ioni de CO_3^{2-} ;

d - pKa pentru apolactoferina umană în conformația închisă.

Aminoacizii din centrul activ al proteinei, direct implicați în legarea ionilor de fier(III) sunt marcați cu asterisk.

Figura 3.11 prezintă dependența sarcinii totale a lactoferinei în conformația deschisă și închisă calculate în funcție de pH-ul mediului. Curbele obținute au forma caracteristică tuturor proteinelor din familia de transferine. De asemenea, a fost calculat punctul izoelectric al proteinei cu valoarea de 9,48 pentru conformația deschisă și 9,78 pentru conformația închisă. Aceste valori corespund cu valorile punctului izoelectric determinate experimental, menționate în literatura de specialitate [195, 196].



Fig. 3.11. Dependența sarcinii totale a lactoferinei în conformația deschisă (linie continuă) și închisă (linie punctată) calculate în funcție de pH-ul mediului [195].

Analiza valorilor pKa ale celor patru conformații ale lactoferinei confirmă faptul că legarea sau eliberarea ionilor de fier este permisă doar pentru anumite stări de protonare ale aminoacizilor implicați în aceste procese. Starea de protonare a acestor aminoacizi este determinată de interacțiunile electrostatice în care aceștia sunt implicați [195].

3.7. Calculul potențialului electrostatic pe suprafață

Un rol important în evaluarea stabilității și a relației dintre structura și funcția proteinelor este atribuit interacțiunilor electrostatice. Analiza electrostatică implică calculul distribuției potențialului electrostatic pe suprafața moleculei proteice.

Proprietățile electrostatice influențează asupra activității biochimice a proteinelor, precum capacitatea de a lega substratul sau alte proteine. Astfel, evaluarea potențialului electrostatic pe suprafață reprezintă o etapă necesară de realizat.

La pH-ul fiziologic (7,4) lactoferina este capabilă de a fixa ionii de fier rezultând în tranziția conformației de la forma deschisă la forma închisă. Scăderea pH-ului până la 5,0

declanșează deschiderea lobului N și eliberarea ionului de fier. Reprezentarea grafică a lobului N, constituit din subdomeniile N1 și N2, este prezentată în Figura 3.2.B. La valori ale pH-ului mai mici de 3,5 lobul C eliberează ionul de fier. Reprezentarea grafică a lobului C, ce include subdomeniile C1 și C2, este prezentată în Figura 3.2.B. Toate aceste procese vor induce perturbații ale potențialului electrostatic pe suprafața proteinei. Prin urmare, calcule ale potențialului electrostatic pe suprafață au fost efectuate pentru valori ale pH-ului 3,5; 5,0 și 7,4 (pH fiziologic). Starea de protonare a resturilor de aminoacizi ai lactoferinei a fost desemnată în conformitate cu pH-ul ales. Figura 3.12 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.

Apolactoferina în conformația închisă



Apolactoferina în conformația deschisă



Potențialul Electrostatic pe Suprafață

Suprafața de Contur a Potențialului Electrostic

Fig. 3.12. Reprezentarea grafică a distribuției potențialului electrostatic mapat pe suprafața moleculei de apolactoferină în conformația închisă și deschisă.

Analizând rezultatele obținute de pe urma acestui studiu (Figura 3.12) se poate observa că tranziția de la forma deschisă la forma închisă rezultă în redistribuirea sarcinii negative pe suprafața moleculei proteice. Astfel, capacitatea de legare a proteinei depinde de proprietățile de suprafață ale acesteia, care influențează flexibilitatea proteinei.

Figura 3.13 reprezintă distribuția potențialului electrostatic pe suprafață în centrul activ al proteinei din lobul N în forma deschisă, modelat pentru valori ale pH-ului 3,5; 5,0 și 7,4. Analiza rezultatelor obținute indică asupra faptului că valoarea pH-ului mediului influențează direct distribuția potențialului electrostatic pe suprafață. Micșorarea pH-ului mediului va contribui la extinderea regiunilor cu sarcină pozitivă pe suprafața proteinei, inducând respingerea electrostatică între reziduurile aminoacizilor inclusiv și a celor din centrii activi ai proteinei, provocând deschiderea lobului N și eliberarea ionului de fier.



pH 3,5

pH 5,0

pH 7,4

Fig. 3.13. Reprezentarea grafică a distribuției potențialului electrostatic pe suprafață, în funcție de pH, în centrul activ din lobul N al proteinei în forma deschisă.

3.8. Caracterizarea spectrală a lactoferinei umane în domeniul IR

Spectroscopia în infraroșu cu transformata Fourier (FTIR) este o metodă experimentală utilizată pentru caracterizarea structurală a polipeptidelor și a proteinelor, atât în soluție cât și în stare cristalină. Această tehnică poate fi utilizată pentru cercetarea structurilor secundare (structurile α -helix, β -pliate, etc.) din componența proteinelor dar și pentru identificarea resturilor de aminoacizi ai moleculei proteice ce determină rolul biologic al proteinei. Spectroscopia FTIR a fost aplicată pentru caracterizarea conformațională a lactoferinei umane saturată cu ioni de fier trivalent (90 %) (complexul Fe(III)-lactoferină umană).

Spectrul FTIR înregistrat pentru lactoferina umană în stare cristalină este prezentat în Figura 3.14. Spectrul a fost analizat pentru evidențierea aminoacizilor din structura proteică, dar și pentru evidențierea structurilor secundare ce determină conformația proteinei.



Fig. 3.14. Spectrul FTIR înregistrat pentru complexul Fe(III)-lactoferină umană.

În Tabelul 3.6 sunt prezentate datele spectrale pentru resturile de aminoacizi din structura lactoferinei umane identificate în spectrul FTIR înregistrat. Deși, cele mai proeminente benzi în spectrele FTIR sunt cele caracteristice grupării amide primare, secundare și terțiare, totuși, a fost posibilă evidențierea prezenței aminoacizilor precum histidina, lizina, tirozina, fenilalanina, acidul aspartic, triptofanul, serina și treonina (Tabelul 3.6). Aminoacizii care prezintă un interes deosebit sunt histidina, tirozina și acidul aspartic, întrucât aceștia sunt implicați direct în legarea ionilor de Fe(III).

Semnalul înregistrat la 1631,3 cm⁻¹ a fost desemnat vibrației de întindere C=C a histidinei, peak-ul înregistrat se suprapune cu peak-ul caracteristic benzii grupării amide primare.

Conform literaturii de specialitate [198], gruparea carboxilică a acidului aspartic prezintă un maxim de absorbție în apropierea 1402 cm⁻¹, însă poziția peak-ului se deplasează cu +60/-90 cm⁻¹ în prezența cationului metalic. În spectrul FTIR înregistrat pentru lactoferina umană, semnalul apare la 1392,5 cm⁻¹, fiind deplasat cu 9,5 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).

Vibrații	Numere	de undă (cm ⁻¹)
	Date experimentale	Date din literatură [198]
Histidina, vibrația de întindere C=C din	1631,3	1631
inelul imidazol		
Amida primară, vibrația de		1690 - 1600
întindere C=O		
Lizina, vibrația de deformare NH_3^+	1528,9	1526-1527
Amida secundară, vibrația de		1575 - 1480
întindere C-N		
Tirozina, vibrația de întindere CC și	1516,2	1516-1518
vibrația de deformare C-H din regiunea		
4-metilfenol		
Amida secundară, vibrația de		1575 - 1480
întindere C-N		
Fenilalanina, vibrația de deformare CH ₂	1447,5	1445-1480
Acidul aspartic, vibrația de întindere C-O	1392,5	1402, poziția benzii se
din gruparea carboxilică		deplasează cu +60/-90 cm ⁻¹
		în prezența cationului
		metalic
Tirozina, vibrația de întindere C-O și CC	1236,3	1235-1270
din regiunea 4-metilfenol		
Amida terțiară, vibrația de		1301 - 1229
întindere C-N		
Tirozina, vibrația de deformare C-OH	1165,5	1169-1260
din regiunea 4-metilfenol		
Triptofan, vibrația de întindere NC și	1067,1	1064
CC, de deformare C-H din regiunea		
benzopirol		
Serina, vibrația de întindere C-O	980,5	983
Treonina, vibrația de deformare C-O din	740,8	724-1174
gruparea carboxilică		

Tabelul 3.6. Frecvențele de vibrație ale resturilor de aminoacizi din structura complexului Fe(III)-lactoferină umană, identificate în spectrul FTIR

În spectrul FTIR înregistrat au fost identificate trei semnale ale tirozinei la 1516,2; 1236,3 și 1165,5 cm⁻¹. Semnalul primar al tirozinei a fost înregistrat la 1516,2 cm⁻¹. În literatură [198] se specifică că acest semnal este asociat cu starea de protonare a tirozinei, astfel în forma protonată semnalul apare la 1516 cm⁻¹, 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 1235-1270 cm⁻¹ aparține tirozinei protonate, fiind asociat cu semnalul secundar. Banda înregistrată la 1165,5 cm⁻¹ este semnalul terțiar al tirozinei, fiind asociat cu vibrația de deformare C-OH din regiunea 4-metilfenol.

Analiza structurilor secundare presupune identificarea benzilor caracteristice grupării amide ce leagă aminoacizii din structura proteinei. Cele mai proeminente benzi în spectrele FTIR sunt cele caracteristice grupării amide primare (1600-1690 cm⁻¹), grupării amide secundare (1480-1575 cm⁻¹) și grupării amide terțiare (1229-1301 cm⁻¹) [198, 199]. În cadrul etapei de analiză a structurilor secundare, s-au identificat benzile caracteristice amidelor primare, secundare și terțiare în spectrul FTIR înregistrat pentru lactoferina umană (Tabelul 3.7).

Structura secundară	Numere de u	umere de undă (cm ⁻¹)		
_	Date experimentale	Date din literatură		
		[198, 199]		
	Banda amidei primare	$e(1690 - 1600 cm^{-1})$		
Structurile de tip foaie β -pliată	1631,3	1623-1641		
Structurile de tip α -helix	1305,2	1648-1657, 1305		
	Banda amidei secundar	re (1575 - 1480cm ⁻¹)		
Structurile de tip foaie întoarcere- β (β -turn)	1528,9	1528, 1577		
	Banda amidei terțiare	$e(1301 - 1229 cm^{-1})$		
Structurile de tip foaie β -pliată	1236,3	1235-1270		

Tabelul 3.7. Structurile secundare din molecula complexului Fe(III)-lactoferină umană

Semnalele înregistrate la 1631,3 cm⁻¹, 1528,9 cm⁻¹ și 1236,3 cm⁻¹ sunt conferite de structurile de tip foaie β -pliată și întoarcere- β (Tabelul 3.7). Analiza de grafică moleculară a structurii lactoferinei umane, determinată experimental cu ajutorul tehnicii de difracției de raze-X (fișierul 1B0L.pdb), evidențiază prezența structurilor secundare de tip α -helix. Prezența structurilor de tip α -helix în spectrul înregistrat poate fi 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 [198] este înglobat în banda structurilor de tip β -pliate.

3.9. Concluzii la capitolul 3

În acest compartiment 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 Baza de Date pentru Proteine și pachete de programe de simulare și analiză: H++ server, PDB2PQR server, APBS și VMD. Au fost elaborate o serie de protocoale de cercetare și caracterizare structurală a lactoferinei umane.

Studiul gradului de similitudine dintre moleculele lactoferinei utilizând metoda de *aliniere multiplă* a secvențelor a arătat că în general structura moleculei de lactoferină umană este bine conservată printre speciile cercetate.

Modelul de rezoluție înaltă al lactoferinei umane preluat din Banca de Date pentru Proteine a fost validat experimental prin metoda de împrăștiere la unghiuri mici cu raze-X.

Evaluarea valorilor constantelor de aciditate 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 implicați în aceste procese. Mai mult, a fost subliniată importanța participării argininei din poziția 121 și 210 din lobul N al lactoferinei în procesul de închidere / deschidere al proteinei.

Valoarea pH-ului mediului influențează direct distribuția potențialului electrostatic pe suprafață. Micșorarea pH-ului va contribui la extinderea regiunilor cu sarcina pozitivă pe suprafața proteinei. Rezultatele obținute conduc la concluzia 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.

Analiza spectrală în domeniul IR a lactoferinei umane a permis evidențierea structurilor secundare α -helix, β -pliate din componența acesteia, care influențează direct mobilitatea proteinei. De asemenea, prin spectroscopia FTIR au fost identificați aminoacizii precum histidina, tirozina și acidul aspartic, ce determină rolul biologic al proteinei.

4. SIMULĂRI DE DINAMICĂ MOLECULARĂ

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

Obiectivul principal al acestui studiu este de a caracteriza comportamentul lactoferinei utilizând metoda de simulare de dinamică moleculară. Obiectivul acestui studiu se realizează prin elaborarea unui protocol de cercetare pentru studierea structurilor moleculare biologice care combină o serie de metode de cercetare și caracterizare structurală, pregătirea configurației de pornire și crearea sistemului molecular pentru simulare, experimente de simulare de dinamică moleculară și interpretarea datelor obținute.

4.1. Bazele teoretice ale simulărilor de dinamică moleculară

Simularea moleculară

Simularea moleculară constituie un set de instrumente ce îmbină calcule teoretice și tehnici computaționale utilizate pentru a studia proprietățile sistemelor moleculare în termeni de structură și interacțiuni la scală microscopică [200]. Aceste metode de studiu pot oferi informații noi, ce nu sunt accesibile în experimentele de laborator. Simulările computaționale pot fi considerate ca metode experimentale "virtuale" ce fac legătura între teorie și experimentele de laborator [201, 202].

O simulare de dinamică moleculară constă în generarea unei configurații de pornire din structura moleculară determinată experimental și simularea condițiilor ce imită un mediu natural pentru această structură moleculară. Calitatea modelului dinamic obținut depinde de calitatea configurației de pornire. Prin urmare, dinamica moleculară poate fi utilizată pentru abordarea unor întrebări specifice legate de proprietățile sistemului-model studiat. Simulările de dinamică moleculară se referă în primul rând la energia sistemului molecular construit în baza structurii studiate. Astfel, etapa inițială în realizarea unui studiu de modelare moleculară constă în descrierea problemei din punct de vedere al relației structură-energie. Teoretic, există două modalități de studiu a energiei unor astfel de sisteme molecularea interacțiunilor și evaluarea energiei potențiale a sistemului în funcție de coordonatele atomice al modelului molecular; (II) modelul mecanicii cuantice ce descrie energia unei molecule în funcție de interacțiunile între nuclee și electroni descrise de ecuația Schrödinger [203, 204]. Principiile mecanicii cuantice sunt

mult mai potrivite pentru a descrie dinamica și proprietățile sistemelor moleculare [205]. Însă, din cauza limitărilor impuse de tehnologia computațională disponibilă în prezent, este aproape imposibil de a cerceta prin metoda mecanicii cuantice sistemele moleculare. Prin urmare, pentru cele mai multe sisteme moleculare se va alege metoda mecanicii moleculare care apelează la aproximări precum ignorarea descrierii cuantice a electronilor [206, 207].

Mecanica moleculară

Mecanica moleculară calculează structura și energia moleculelor în baza interacțiunilor intramoleculare. Această metodă de studiu nu tratează electronii în mod explicit, însă se presupune că aceștia se vor regăsi într-o distribuție optimă odată ce se vor cunoaște pozițiile nucleelor [207]. Această presupunere se bazează pe aproximația Born-Openheimer în care se ține cont de faptul că nucleele au masă mult mai mare decât electronii, astfel încât aceștia din urmă își ajustează instantaneu pozițiile odată cu mișcarea nucleelor [208, 209]. În modelele mecanicii moleculare atomii sunt priviți ca sfere rigide cu raze fixe, obținute teoretic sau experimental, iar legăturile chimice sunt considerate arcuri. Interacțiunile intramoleculare pe care le suferă modelul cercetat sunt descrise prin funcții matematice simple. De exemplu, legea lui Hooke este utilizată pentru a urmări interacțiunile între atomii legați, iar interacțiunile între atomii nelegați pot fi ușor descrise de funcția Lennard-Jones. O simulare de dinamică moleculară a modelelor simplificate rezolvă numeric ecuația de mișcare a lui Newton, ceea ce face posibilă urmărirea fluctuațiilor structurale pe care le suferă sistemul în timp [210].

Metoda dinamicii moleculare

Dinamica moleculară este o metodă de simulare moleculară ce descrie mișcarea moleculară și interacțiunile din sistemul modelat, luând în calcul parametrii precum temperatura, presiunea și interacțiunea cu solventul. Metoda a fost introdusă de către B.J. Alder și T.E. Wainwright, în anul 1959 pentru cercetarea sferelor rigide [211]. Simularea de dinamică moleculară a proteinelor a fost realizată pentru prima dată de J.A. McCammon, B.R. Gelin și M. Karplus în 1977 [202], iar 25 de ani mai târziu premiul Nobel este oferit lui M. Karplus pentru elaborarea unor modele pentru sistemele chimice complexe. Simularea de dinamică moleculară a proteinelor presupune determinarea energiei potențiale corespunzătoare conformației proteinei, adică calculul energiei potențiale de interacțiune a atomilor constituenți ca funcție de distanțele și unghiurile dintre aceștia. Scopul simulărilor de dinamică moleculară este de a examina comportamentul structural al sistemului și de a lega acest comportament de energia potențială. Această tehnică cere cunoașterea funcției ce exprimă energia potențială a sistemului în funcție de

coordonatele relative ale atomilor. O importantă caracteristică a simulărilor de dinamică moleculară este că aceasta descrie mișcarea individuală a atomilor în timp. Metoda simulării dinamicii moleculare generează o traiectorie (configurație moleculară ca funcție a timpului) a unui sistem molecular prin integrarea simultană a ecuației de mișcare a lui Newton pentru toți atomii sistemului molecular:

$$F_i = m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t^2} \tag{4.1}$$

Vectorul de poziție în sistemul de coordonate carteziene r_i este o funcție de timp t, iar F_i este forța exercitată de către atomii sistemului molecular asupra unui atom i din sistem.

În practică, traiectoriile simulărilor de dinamică moleculară nu pot fi obținute direct din ecuația de mișcare a lui Newton din cauza lipsei unei soluții analitice. Cunoscând forța F_i și masa m_i pentru fiecare atom din modelul molecular, întâi se calculează accelerația atomului a_i . După care, viteza v_i se calculează din relația:

$$a_i = \frac{dv_i}{dt} \tag{4.2}$$

În final, vectorul de poziție r_i se calculează din relația:

$$v_i = \frac{dr_i}{dt} \tag{4.3}$$

Astfel, ecuațiile de mișcare cuplate sunt rezolvate pas cu pas [212]. Algoritmul dinamicii moleculare integrează numeric ecuațiile de mișcare Newton pentru a genera traiectoriile. Cu toate că există unele limitări, în prezent, mai mulți algoritmi sunt utilizați pentru calcularea traiectoriilor.

Câmpul de forțe

Metodele mecanicii moleculare, inclusiv simulările de dinamică moleculară se bazează pe aproximarea empirică a câmpului de forțe pentru calcularea interacțiunilor intramoleculare și evaluarea energiilor potențiale ale sistemului cercetat.

Un câmp de forțe este o expresie matematică care îmbină funcții analitice clasice ce descriu interacțiunile atomilor din sistemul modelat. Câmpul de forțe este forma analitică a potențialului interatomic $U(r_1, r_2, \dots r_N)$, ce reprezintă energia potențială a N atomi ce interacționează în funcție de poziția acestora, r_i [213]. Câmpurile de forțe sunt calibrate conform rezultatelor experimentale și calculelor cuanto-mecanice pentru modele de compuși de dimensiuni mici. Un câmp de forțe tipic include următoarele tipuri de interacțiuni:

- întinderea legăturii;

- deformarea unghiului de valență;
- torsiunea legăturii;
- interacțiuni între atomii nelegați.

Ecuațiile însumate ale acestor interacțiuni precum și parametrii necesari pentru descrierea atomilor și legăturilor chimice reprezintă câmpul de forțe [214], redat de expresia matematică:

$$U = \sum_{\substack{leg \ \check{a}tur \ i}} \frac{1}{2} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{\substack{ung \ hiuri}} \frac{1}{2} k_b (\theta - \theta_0)^2 \sum_{\substack{torsiuni}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \delta)]$$

+
$$\sum_{\substack{impropri \ i}} V_{imp} + \sum_{\substack{LJ}} 4\epsilon_{ij} \left(\frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}^6}\right) + \sum_{\substack{elec}} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$
(4.4)

4.2. Procedura simulării de dinamică moleculară

Configurațiile de pornire pentru experimentele de simulare de dinamică moleculară sunt create în baza structurilor moleculare determinate experimental cu ajutorul tehnicilor de difracție de raze-X și rezonanță magnetică nucleară. Pentru acest studiu, fișierele ce conțin coordonatele inițiale ale structurii proteice au fost preluate din Banca de Date pentru Proteine.

Toate experimentele de simulare de dinamică moleculară din cadrul acestui studiu au fost realizate utilizând pachetul de programe GROMACS v4.5 [215-218]. Acest pachet de programe rulează în mediul de operare Linux.

Protocolul procedurii generale de realizare a unui experiment de simulare de dinamică moleculară cu pachetul de programe GROMACS include următoarele etape:

- 1. evaluarea calității fișierului de structură de tip PDB și generarea fișierelor ce conțin coordonatele inițiale ale atomilor din structura proteinei cercetate;
- 2. generarea fișierului cu topologia moleculară;
- 3. stabilirea condițiilor periodice de limită;
- 4. minimizarea energiei potențiale;
- 5. echilibrarea sistemului;
- 6. simularea de dinamică moleculară;
- 7. analiza traiectoriilor rezultate.

Fișierele PDB sunt utilizate pentru *generarea fișierelor ce conțin coordonatele inițiale ale atomilor din structura proteică* precum și viteza inițială a acestora. Viteza inițială a atomilor este generată aleatoriu astfel încât să se respecte distribuția Maxwell-Boltzmann. *Topologia moleculară* conține informația despre atomii din sistemul studiat, inclusiv, lungimea legăturilor, unghiul legăturilor, masa atomilor, sarcinile parțiale.

Simulările de dinamică moleculară a sistemelor macromoleculare precum proteinele sau acizii nucleici în solvent, necesită impunerea *condițiilor periodice de limită* pentru a reduce efectul produs de dimensiunea sistemului. Astfel, fișierele de structură inițială și topologie moleculară sunt utilizate pentru generarea modelelor computaționale care reprezintă o cutie de reacție de formă geometrică cubică, octaedru sau rombic dodecaedru în care se conține sistemul molecular studiat și solventul. Dimensiunile cutiei de reacție sunt stabilite reieșind din dimensiunea proteinei.

Minimizarea energiei potențiale se face în scopul de a obține valori minime locale al energiei potențiale. Această etapă este necesară pentru eliminarea interacțiunilor de nelegătură de natură repulsivă dar și eventualele distorsiuni geometrice ce generează perturbații în câmpul de forțe.

Echilibrarea sistemului este etapa la care ansamblul molecular optimizat este echilibrat în vederea uniformizării temperaturii utilizând ansamblul termodinamic izoterm-izocor și echilibrarea presiunii prin ansamblul termodinamic izoterm-izobar. Etapa de minimizare a energiei sistemului asigură calitatea sistemului modelat în termeni de geometrie și orientarea solventului. Însă pentru experimentele de dinamică moleculară a proteinelor în soluție este necesară etapa de echilibrare a solventului și ionilor cu proteina cercetată. Pentru experimentele de dinamică moleculară în vid această etapă este omisă.

Simularea de dinamică moleculară propriu-zisă este etapa în care se descrie dinamica și interacțiunile din sistemul cercetat, luând în calcul temperatura, presiunea și interacțiunea cu solvenții. Înainte de reluarea acestei etape se cunosc coordonatele carteziene, energiile și setul inițial de viteze pentru fiecare atom din sistemul cercetat. Asupra sistemului se acționează cu o forță într-un interval de timp prestabilit pentru a simula mișcarea sistemului.

Analiza traiectoriilor rezultate se realizează pentru a evalua modificările apărute în sistemul cercetat și pentru a răspunde la întrebările științifice prestabilite [220].

Experimentele de dinamică moleculară în cadrul acestui studiu au fost realizate pe sistemul de operare Linux kernel: Fedora v17 (64-bit).

4.3. Simularea de dinamică moleculară a lactoferinei

Metodologia simulărilor de dinamică moleculară a fost testată pe sisteme model, în care s-a utilizat molecula de lizozimă, și a fost implementată cu succes pe molecula de lactoferină umană. Studiul dinamicii moleculare a lactoferinei a fost orientat în două direcții: (i) cercetarea stabilității lactoferinei în diferite conformații și (ii) studierea rolului unor resturi de aminoacizi din apropierea sferei de coordinare a ionilor metalului din centrul activ al lactoferinei.

Modelele de difracție de raze-X, de rezoluție înaltă, ale moleculelor de apolactoferină (1LFH.pdb [221]) și hololactoferină (1B0L.pdb [171]) au fost utilizate pentru generarea configurațiilor de pornire în experimentele de simulare. Structura hololactoferinei a fost validată anterior (capitolul 3). Aceste două modele proteice au fost întâi rafinate prin eliminarea tuturor moleculelor de apă. Atomii ce lipseau din structura resturilor aminoacizilor, arginina din poziția 86 (Arg-86) și glutamina din poziția 418 (Gln-418), ai moleculei de hololactoferină au fost reconstruiți cu ajutorul aplicației Swiss-PdbViewer [222]. În continuare, fișierul cu informația de structură a hololactoferinei a fost folosit pentru generarea a două structuri adiționale: conformația închisă a apolactoferinei și lactoferina în conformația închisă ce conține doi ioni de carbonat. Cele patru modele de lactoferină au fost utilizate pentru experimentele de dinamică moleculară. Sistemele simulate sunt prezentate în Tabelul 4.1.

Modelul simulat	Compoziția modelului	Durata simulării
S1	Apolactoferina în conformația deschisă	5 ns
S 2	Apolactoferina în conformația închisă	5 ns
S 3	Apolactoferina în conformația închisă + 2 CO_3^{2-}	5 ns
S 4	Hololactoferina	5 ns

Tabelul 4.1. Sumarul simulărilor de dinamică moleculară realizate pentru evaluarea stabilității lactoferinei în diferite conformații

În cadrul etapei de evaluare a stării de protonare a aminoacizilor din lobul N al lactoferinei prin metoda de calcul a *pKa* realizată în capitolul 3 a fost subliniată implicarea argininei din pozițiile 121 (Arg-121) și 210 (Arg-210) în procesul de închidere și deschidere al lobului N al proteinei. Aminoacizii Arg-121 și Arg-210 fac parte din sfera a doua de coordinare a ionului de Fe(III) în centrul activ al proteinei. Astfel, pentru a evalua rolul acestor două arginine în procesul de legare a ionului de Fe(III) au fost create două modele adiționale: hololactoferina din structura căreia a fost îndepărtată arginina din poziția 121 și hololactoferina fără arginina din poziția 210. Tabelul 4.2 prezintă sumarul experimentelor de dinamică moleculară realizate în cadrul acestui studiu.

Programul PDB2PQR Server [223, 224] a fost utilizat pentru a desemna starea de protonare a tuturor resturilor de aminoacizi din structura proteică a modelului simulat,

corespunzătoare pH-ului fiziologic de 7,4. Câmpul de forțe OPLS-AA (Optimized Potential for Liquid Simulations [225]) a fost utilizat pentru construirea topologiei proteinei.

Sistemele modelate pentru experimentele de dinamică moleculară conțin ioni ce nu sunt definiți în câmpurile de forțe ale pachetului de programe GROMACS. Astfel, sarcinile atomice ale ionului de carbonat au fost preluați din literatură [226]. Parametrii potențialului Lennard-Jones ai ionilor de Fe(III) în soluție au fost preluați din literatură [227].

Modelul simulat	Compoziția modelului	Durata simulării
S4	Hololactoferina	5 ns
S5	Hololactoferina fără Arg-121	5 ns
S 6	Hololactoferina fără Arg-210	5 ns

Tabelul 4.2. Sumarul simulărilor de dinamică moleculară realizate pentru evaluarea rolului unor resturi de aminoacizi din structura proteică

Inițial, modelul proteinei a fost plasat într-o celulă de reacție de formă cubică. Celula a fost setată astfel încât să aibă 10 Å profunzime în jurul proteinei. Condițiile periodice de limită au fost aplicate în toate direcțiile celulei de reacție. Ulterior, cutia de reacție a fost umplută cu molecule de apă modelate de funcția TIP3P [228], iar pentru neutralizarea sarcinii electrice în sistemul creat s-au adăugat ioni de clor. Figura 4.1 prezintă imaginea sistemului obținut. După care a urmat minimizarea energiei potențiale a sistemului timp de 100 picosecunde (ps) folosind algoritmul *steepest descent*.

Pentru a stabiliza temperatura întregului sistem, după etapa de minimizare, acesta a fost echilibrat timp de 500 ps folosind ansamblul termodinamic izoterm-izocor NVT (număr constant de atomi, N, volum constant, V și temperatură constantă, T). Temperatura a fost menținută constantă prin utilizarea termostatului Berendsen.

Stabilizarea presiunii s-a realizat prin echilibrare sistemului timp de 500 ps folosind ansamblul termodinamic izoterm-izobar NPT (număr constant de atomi, N, presiune constantă, P și temperatură constantă, T). Presiunea a fost menținută constantă prin utilizarea barostatului Parinello-Rhaman [229]. După care au urmat simulările de dinamică moleculară propriu-zise.

Distanța *cutoff* pentru interacțiunile van der Waals a fost de 14 Å. Calculul forțelor electrostatice îndepărtate a fost realizat prin metoda PME (*particle-mesh Ewald*) cu dimensiunile nodurilor de 1 Å. În timpul simulării lungimea legăturilor a fost constrânsă cu algoritmul LINCS (*Linear Constraint Solver* [230]). 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. Traiectoria sistemelor simulate a fost analizată pentru atomii de carbon Cα, care constituie primul atom de carbon atașat de gruparea funcțională din structura aminoacidului. Timpul total dedicat experimentelor de dinamică moleculară este prezentat în Tabelul 4.3. Analiza simulărilor s-a realizat cu programele GROMACS și VMD. Reprezentările grafice au fost produse cu programul VMD.



Fig. 4.1. Reprezentarea grafică a modelului de lactoferină în celula de reacție cu apă.

Sistemul modelat	S 1	S2	S 3	S 4	S5	S 6
Timpul de calcul	60h 49min	64h 22min	56h 43min	55h 52min	62h 13min	59h 31min

Tabelul 4.3. Timpul de calcul dedicat experimentelor de dinamică moleculară

4.4. Evaluarea calității experimentelor de dinamică moleculară

Procedura generală de realizare a experimentelor de simulare de dinamică moleculară poate fi divizată în trei etape generale: prima este pregătirea configurației de pornire și crearea sistemului molecular pentru simulare, minimizarea energiei și echilibrarea, a doua este însăși rularea simulării și producerea traiectoriei, iar a treia este analiza traiectoriilor și interpretarea datelor obținute. Ultima etapă poate fi divizată în alte trei subetape:

- verificarea calității experimentelor de dinamică moleculară. În această etapă se verifică evoluția în timp a energiei potențiale, temperatura, presiunea și densitatea sistemului;

- realizarea analizelor menite să răspundă la întrebările ştiinţifice propuse pentru desfăşurarea simulării de dinamică moleculară;
- analiza comparativă a rezultatelor obținute din mai multe simulări pentru evaluarea complexă a problemei cercetate.

Verificarea calității experimentelor de dinamică moleculară se realizează la diferite etape ale experimentului de simulare de dinamică moleculară.

Astfel, evaluarea calitativă a rezultatului obținut din etapa de minimizare a energiei sistemului modelat se realizează prin verificarea energiei potențiale, ale cărei valori trebuie sa fie negative și de ordinul 10⁵-10⁶ (în dependență de mărimea sistemului modelat și de numărul de molecule de apă). Figura 4.2 prezintă ca exemplu evoluția minimizării energiei potențiale în sistemul modelat S1. Calitatea modelelor computaționale și deci implicit și a etapei de echilibrare a temperaturii sistemelor modelate a fost testată prin verificarea evoluției temperaturii sistemului (Figura 4.3).



Fig. 4.2. Evoluția minimizării energiei potențiale în sistemul modelat S1.



Fig. 4.3. Temperatura versus timpul de simulare pentru modelul S1.

Calitatea etapei de echilibrarea a presiunii în sistemele modelate a fost testată prin verificarea cu atenție a evoluției presiunii sistemelor modelate (Figura 4.4), dar și prin verificarea densității (Figura 4.5).



Fig. 4.4. Presiunea versus timpul de simulare pentru modelul S1.



Fig. 4.5. Densitatea versus timpul de simulare pentru modelul S1.

După fiecare etapă de echilibrare realizată în cadrul experimentelor de dinamică moleculară, parametrii precum energia potențială, temperatura, presiunea și densitatea prezintă valori stabile. O concordanță excelentă a fost găsită între densitatea sistemelor modelate și densitatea apei după aplicarea etapelor de echilibrare.

Valorile medii ale parametrilor esențiali ai sistemelor modelate, stabiliți prin proceduri de minimizare și echilibrare ale sistemelor studiate sunt prezentate în Tabelul 4.4. Sistemele modelate echilibrate din punct de vedere energetic dar și optimizate geometric în continuare au fost utilizate pentru rularea simulărilor de dinamică moleculară propiu-zise.

Sistemul	Energia	Temperatura,	Presiunea,	Densitatea,
modelat	potențială, kJ/mol	K	bar	kg/m ³
S 1	-2604400	299,907	1,04271	1007,61
S2	-2519410	299,904	1,02411	1008,30
S 3	-2495210	299,916	1,02478	1008,40
S 4	-2515200	299,905	1,02467	1008,80
S5	-2524950	299,919	1,00756	1008,69
S6	-2504270	299,920	1,02423	1008,65

Tabelul 4.4. Valorile medii ale parametrilor esențiali ai sistemelor modelate, stabiliți prin proceduri de minimizare și echilibrare

4.5. Evaluarea stabilității lactoferinei în diferite conformații

Experimentele de simulare de dinamică moleculară au fost realizate în scopul evaluării stabilității moleculei proteice de lactoferină în patru conformații: apolactoferina deschisă, apolactoferina închisă, apolactoferina în conformația închisă + $2CO_3^{2-}$ și hololactoferina (lactoferina în conformația închisă + $2CO_3^{2-}$ + $2Fe^{3+}$). În continuare ne vom referi la aceste sisteme ca S1, S2, S3, S4, după cum este indicat în Tabelul 4.1.

Analiza comparativă a comportamentului proteinelor la nivel unimolecular a fost realizată cu ajutorul pachetelor de programe GROMACS, XmGrace și VMD.

Prima etapă în evaluarea experimentelor de dinamică moleculară constă în verificarea caracterului compact al structurii proteice din sistemul simulat. La această etapă s-a verificat evoluția razei de girație a proteinei în sistem de-a lungul timpului de simulare. *Raza de girație* este un parametru ce descrie conformația proteinei și este definită ca distanța pătratică medie a constituenților masici ai proteinei față de centrul de masă:

$$R_g = \left(\frac{\sum_i \|r_i\|^2 m_i}{\sum_i m_i}\right)^{\frac{1}{2}}$$
(4.5)

unde, parametrul m_i este masa atomului i, iar r_i este poziția atomului i față de centrul de masă a moleculei proteice.

Evoluția fluctuațiilor valorilor razei de girație a lactoferinei, în cele patru sisteme modelate, a fost evaluată pe toată perioada de simulare. Din Figura 4.6 se observă că cele mai pronunțate modificări ale conformației suportă lactoferina din sistemul S2 și S4.



Fig. 4.6. Raza de girație a lactoferinei versus timpul de simulare a sistemelor S1, S2, S3 și S4.

În continuare, sistemele modelate au fost caracterizate din punct de vedere energetic utilizând pachetul de programe GROMACS. Contribuțiile energetice la valoarea energiei totale ale sistemelor simulate sunt prezentate în Tabelul 4.5.

Sistemele	Energia potențială,	Energia cinetică,	Energia totală,
modelate	kJ/mol	kJ/mol	kJ/mol
S1	-2204160	411202	-1792950
S2	-2124100	396226	-1727880
S 3	-2125400	396249	-1729150
S4	-2134180	396235	-1737950

Tabelul 4.5. Caracteristicile energetice ale sistemelor modelate

Următoarea etapă de analiză a rezultatelor simulărilor de dinamică moleculară constă în evaluarea traiectoriilor obținute. Traiectoria sistemelor pe parcursul etapei de simulare de dinamică moleculară a fost analizată prin intermediul evoluției devierii medii pătratice pentru atomii de carbon Cα (Figura 4.7). *Devierea medie pătratică* (RMSD) este utilizată în analiza simulărilor de dinamică moleculară pentru a măsura distanța medie dintre atomii din structura proteică utilizând ca referință structura inițială a proteinei din sistemul simulat. Pachetul de programe GROMACS calculează RMSD-ul după ecuația matematică:

$$RMSD(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^{N} m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2\right]^{\frac{1}{2}}$$
(4.6)

unde $M = \sum_{i=1}^{N} m_i$,

ar $r_i(t_1)$ este poziția atomului *i* în timpul *t*.

Analiza RMSD este aplicată în determinarea tranzițiilor structurale ale secvențelor proteice de-a lungul simulărilor de dinamică moleculară. Curbele RMSD-ului calculate pentru molecula proteică în toate patru sisteme au prezentat diferențieri. Analizând graficul prezentat în Figura 4.7 se poate observa că valorile RMSD cresc brusc în primele 100 ps ale simulării în toate patru sisteme cercetate, atingând valori de 1,5-2,0 Å. Pe perioada întregii simulări valorile RMSD prezintă fluctuații cu valori maxime cuprinse între 2,5-3,8 Å.



Fig. 4.7. Evoluția devierii medii pătratice (RMSD) ale atomilor Cα din structura lactoferinei pe întreaga perioadă a simulării de dinamică moleculară, pentru sistemele studiate.

Reieşind din graficul din Figura 4.7 sistemul S3 prezintă cele mai mici fluctuații indicând că această conformație este și cea mai stabilă dintre cele patru cercetate. Interesant este faptul că S1 și S2 diferă în evoluția RMSD-ului de-a lungul simulării, apolactoferina în forma deschisă fluctuează mai mult decât apolactoferina în forma închisă.

O imagine mai detaliată despre comportamentul moleculelor de lactoferină în sistemele studiate poate fi obținută prin intermediul analizei evoluției fluctuațiilor medii pătratice ale atomilor Cα (Figura 4.8). *Fluctuațiile medii pătratice* (RMSF) sunt devierile standard ale pozițiilor atomice din structura proteică simulată în comparație cu pozițiile atomice din structura proteică de referință. Analiza RMSF permite evaluarea mai detaliată a porțiunilor flexibile din structura proteinei. Rezultatele obținute corespund observațiilor ce au reieșit din analiza evoluției RMSD. Sistemul S4 în care se conține hololactoferina (lactoferina saturată cu ioni de fier (III)) suferă cele mai notabile fluctuații.



Fig. 4.8. Evoluția fluctuațiilor medii pătratice (RMSF) ale atomilor Cα 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.

Aria suprafeței accesibilă solventului este definită ca aria pe care centrul unei molecule de solvent o generează de-a lungul contactului cu molecula proteică. Mișcarea proteinelor în soluție este strâns legată de aria de suprafața. Astfel, analiza fluctuațiilor ariei suprafeței accesibilă solventului în timpul simulărilor de dinamică moleculară oferă informație adițională asupra flexibilității structurale ale proteinei. Graficul ariei suprafeței accesibilă solventului (SASA) versus timpul de simulare (Figura 4.9) oferă o informație diferită decât rezultatele RMSD și RMSF. S-a identificat că sistemul S2 (apolactoferina în conformația închisă) suferă cele mai mari fluctuații. Această observație sugerează ideea că apolactoferina în conformația închisă este cel mai puțin stabilă, astfel rearanjarea conformațională locală este necesară pentru stabilizarea moleculei. Metoda de analiză a ariei de suprafață accesibilă solventului a fost utilizată pentru determinarea suprafeței proteice hidrofobe expuse la solvent. Astfel, suprafața hidrofobă accesibilă solventului constituie 15926 Å² în sistemul S4, 15692 Å² în sistemul S3 și 15451 Å² în sistemul S2. Eliberarea ionilor de Fe(III) precum și a ionilor de carbonat rezultă în modificări ale comportamentului lactoferinei în mediul apos. Legăturile de hidrogen stabilite între aminoacizii lactoferinei în conformația închisă se desfac în timpul tranziției spre conformația deschisă, în consecință resturile de aminoacizi interacționează cu moleculele de apă.



Fig. 4.9. Evoluția ariei suprafeței accesibilă solventului (SASA) calculate pentru traiectorii de 5 ns ale celor patru sisteme cercetate.

În cadrul acestei etape a fost evaluată aria suprafeței accesibilă solventului per reziduu pentru aminoacizii cheie ai lactoferinei în sistemele simulate. În acest sens au fost analizate resturi ale aminoacizilor din sfera de coordinare primară: acidul aspartic din poziția 60 și 395, tirozina din poziția 92, 192, 435 și 528, histidina din poziția 253 și 597. Rezultatele acestei evaluări sunt indicate în Tabelul 4.6.

Resturi ale	S1	S2	S 3	S4
aminoacizilor				
Asp-60	198,198	215,690	222,150	209,461
Tyr-92	279,695	281,239	304,552	292,524
Tyr-192	294,033	302,849	289,500	318,465
His-253	240,508	249,887	264,988	249,240
Asp-395	218,708	224,465	211,776	222,664
Tyr-435	277,937	296,674	290,257	260,346
Tyr-528	293,928	292,190	282,324	294,777
His-597	244,137	255,033	252,342	247,203

Tabelul 4.6. Aria suprafeței accesibilă solventului per rest de aminoacid ($Å^2$)

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. Distanțele dintre aminoacizi de-a lungul simulărilor au fost extrase din traiectoriile structurilor simulate, cu pachetul de programe VMD. În Figura 4.10 se exemplifică evoluția distanțelor dintre resturile aminoacizilor Arg-121:Tyr-92, Arg-121:Tyr-192, His-253:Asp-60 și Tyr-92:Asp-60 de-a lungul simulărilor de dinamică moleculară.



Fig. 4.10. 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.

Din Figura 4.10 se observă 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 proteinei se deschide. Această observație este confirmată de evoluția distanței dintre seturile de aminoacizi Arg-121:Tyr-92 și Arg-121:Tyr-192 în sistemul S2, care după 3 ns ajunge să se suprapună cu evoluția distanțelor acestor seturi de aminoacizi în conformația deschisă a proteinei din sistemului S1. 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.

4.6. Evaluarea rolului unor resturi de aminoacizi din structura proteică

Centrul activ al lactoferinei este constituit din resturile a patru aminoacizi: acidul aspartic, două molecule de tirozină și histidina. Acești aminoacizi formează sfera de coordinare primară a ionului de Fe(III). Aminoacizii din sfera de coordinare secundară influențează indirect fixarea ionilor de Fe(III), prin legăturile de hidrogen pe care le formează cu aminoacizii liganzi. În capitolul 3, în cadrul etapei de evaluare a stării de protonare a aminoacizilor din lobul N al lactoferinei, a fost evidențiată implicarea indirectă a argininei din pozițiile 121 și 210 în procesul de legare a ionilor de Fe(III). Arg-121 și Arg-210 fac parte din sfera a doua de coordinare a ionului de Fe(III) în centrul activ al proteinei. Astfel, pentru a evalua rolul argininei, din cele două poziții ale secvenței proteice, în procesul de legare a ionului de Fe(III), a fost aplicată metoda de simulare de dinamică moleculară. Specificațiile sistemelor simulate sunt prezentate în Tabelul 4.2. Analiza contribuțiilor energetice la valoarea energie totale ale sistemelor simulate nu a evidențiat modificări semnificative (Tabelul 4.7).

Sistemele	Energia potențială,	Energia cinetică,	Energia totală,
modelate	kJ/mol	kJ/mol	kJ/mol
S4	-2134180	396235	-1737950
S5	-2133350	396146	-1737200
S6	-2133530	396162	-1737360

Tabelul 4.7. Caracteristicile energetice ale sistemelor modelate

În continuare a fost aplicată analiza RMSD pentru determinarea tranzițiilor structurale ale secvențelor lactoferinei de-a lungul simulărilor de dinamică moleculară realizate în cadrul acestei etape de studiu. Suprapunerea curbelor RMSD ale sistemelor simulate este prezentată în Figura 4.11. Din analiza comparativă a evoluției RMSD-ului pentru lactoferina din cele trei sisteme modelate (S4, S5 și S6) se observă că absența argininei din poziția 121 (S5), cât și a celei din poziția 210 (S6) induce modificări ale conformației închise a lactoferinei în primele 3 ns de simulare, urmând stabilizarea conformației structurale în ultimele 2 ns. Modificările structurale ale conformației lactoferinei au fost observate și din analiza comparativă a evoluției fluctuațiilor medii pătratice, RMSF, prezentate în Figura 4.12.

Cele mai notabile fluctuații au fost înregistrate în lobul N al lactoferinei din sistemul S6. Mutația argininei din poziția 210 cauzează o restructurare locală a aminoacizilor din lobul N. Datele experimentale prezentate în literatura de specialitate arată că mutația argininei din poziția 210 induce restructurări conformaționale locale, astfel încât lizina din poziția 301 își schimbă conformația pentru a ocupa locul din care lipsește arginina 210, interacționând cu aminoacizii din sfera primară de coordinare, tirozinele din poziția 92 și 192 [231].



Fig. 4.11. Evoluția devierii medii pătratice (RMSD) ale atomilor Cα din structura lactoferinei pentru traiectorii de 5 ns ale sistemelor S4, S5 și S6.

Analiza SASA a fost efectuată pentru a obține informații despre fluctuațiile ce au loc la suprafața proteinei. În Figura 4.13 se observă că lactoferina din sistemul S5 prezintă modificări la suprafață pe parcursul timpului de calcul. 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. Datele prezentate în literatura de specialitate [232] arată că arginina din poziția 121 este responsabilă de fixarea ionului de carbonat pe centrul activ al lobului N al lactoferinei.


Fig. 4.12. Evoluția fluctuațiilor medii pătratice (RMSF) ale atomilor Cα din structura lactoferinei pentru traiectorii de 5 ns ale sistemelor S4, S5 și S6:
(a) pentru aminoacizii din pozițiile 1-350 în structura lactoferinei,
(b) pentru aminoacizii din pozițiile 350-690 în structura lactoferinei.



Fig. 4.13. Evoluția ariei suprafeței accesibile solventului (SASA) calculate pentru traiectorii de 5 ns ale sistemelor S4, S5 și S6.

Din experimentele de simulare de dinamică moleculară, s-a stabilit că mutația argininei din poziția 121 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 4.14).



Fig. 4.14. Reprezentarea schematică a procesului de legare a ionului de Fe(III) în centrul activ al lobului N al lactoferinei umane, prin reacția de complexare.

Analiza SASA a fost aplicată pentru evaluarea resturilor de aminoacizi din sfera primară de coordinare a ionului metalic, rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 4.8.

1		· · · ·		
Resturi ale	S4	S 5	S6	•
aminoacizilor				
Asp-60	209,461	220,077	218,000	•
Tyr-92	292,524	293,462	285,682	
Tyr-192	318,465	290,438	298,128	
His-253	249,240	274,424	278,011	
Asp-395	222,664	213,375	214,460	
Tyr-435	260,346	292,614	289,311	
Tyr-528	294,777	284,354	313,23	
His-597	247,203	260,219	243,803	

Tabelul 4.8. Aria suprafeței accesibilă solventului (SASA) per rest de aminoacid ($Å^2$)

4.7. Concluzii la capitolul 4

În acest compartiment, a fost propusă cercetarea stabilității lactoferinei în diferite conformații și evaluarea rolului argininei din pozițiile 121 și 210 în procesul de legare a ionilor de Fe(III), prin aplicarea metodei de simulare de dinamică moleculară. Pentru realizarea acestui studiu au fost utilizate structuri din Banca de Date pentru Proteine și pachete de programe de simulare și analiză: GROMACS, VMD, XmGrace.

Analiza comparativă a rezultatelor obținute relevă 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. Eliberarea ionilor de carbonat din structura proteinei induce tranziția structurală de la forma închisă spre forma deschisă a lactoferinei. Astfel, prin metoda de simulare de dinamică moleculară a fost demonstrată importanța participării ionilor de carbonat în procesele de legare și eliberare a ionilor de Fe(III).

Simulările de dinamică moleculară, realizate în scopul evaluării rolului unor resturi de aminoacizi din sfera secundară de coordinare, au arătat că mutația argininei din poziția 210 cauzează o restructurare locală a aminoacizilor din lobul N, pe când mutația argininei din poziția 121 conduce la restructurarea conformației lactoferinei în decursul tranziției de la forma închisă

spre forma deschisă a lobului N. 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 destabilizarea ionului de carbonat în centrul activ al lactoferinei.

Astfel, 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). Protocolul de cercetare elaborat în cadrul acestei etape se recomandă pentru studierea macromoleculelor de tip proteină.

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 (R²=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 procedeului dirijat 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 capabilității de producere a nanoparticulelor metalice.
- În cadrul testării capabilității 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 acesteia 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 capabilității microorganismelor de a sintetiza nanoparticule metalice, dar și optimizarea metodelor microbiologice existente pentru modificarea dirijată a parametrilor fizicochimici ai nanoparticulelor de interes științific.

BIBLIOGRAFIE

- 1. Academia Română. Dicționar explicativ al limbii române. Ediția a II-a. Editura: Univers Enciclopedic Gold, 2009. http://www.dexonline.ro (vizitat 16.05.2016).
- Iniţiativa Naţională în Nanotehnologie. http://www.nano.gov/about-nni/what (vizitat 04.07.2015).
- 3. Programul-Cadru al Uniunii Europene pentru Cercetare și Dezvoltare http://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/en/what-horizon-2020 (vizitat 16.05.2016).
- 4. Liu G. et al. Nanostructured high-strength molybdenum alloys with unprecedented tensile ductility. In: Nature Letters, 2013, 12, p. 344-350.
- Tartaj M. et al. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. In: Journal of Physics D: Applied Physics, 2003, 36, p. R182-R197.
- Huber, D.L. Synthesis, Properties, and applications of iron nanoparticles. In: Small, 2005, 1, p. 482–501.
- 7. Wu W. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. In: Nanoscale Research Letters, 2008, 3, p. 397-415.
- 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.
- 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.
- 10. 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.
- Sun S., Zeng H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. In: Journal of the American Chemical Society, 2002, 124(28), p. 8204-8205.
- 12. 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.
- 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.
- 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.
- Yeary L.W. et al. Magnetic properties of bio-synthesized magnetite nanoparticles. In: IEEE Transactions on Magnetics, 2005, 41, p. 4384-4389.

- 16. 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.
- 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.
- Sundaram P.A. et al. Extracellular biosynthesis of iron oxide nanoparticles by *Bacillus* subtilisstrains isolated from rhizosphere soil. In: Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2012, 17, p. 835-840.
- 19. Abdeen S. et al. Evaluation of antimicrobial activity of biosynthesized iron and silver nanoparticles using the fungi *Fusarium oxysporum* and *Actinomycetes sp.* on human pathogens. In: Nano Biomedicine and Engineering, 2013, 5(1), p. 39-45.
- Hulkoti N.I., Taranath T.C. Biosynthesis of nanoparticles using microbes—A review. In: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, 121, p. 474-483.
- Kitching M. et al. Fungal biosynthesis of gold nanoparticles: mechanism and scale up. In: Microbial biotechnology, 2014, p. 1-14.
- 22. 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.
- 23. Bansal V. et al. Biosynthesis of zirconia nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. Journal of Materials Chemistry, 2004, 14, p. 3303-3305.
- 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.
- Duca Gh., et al. Microalgae as possible silver "nanofactories". Book of Abstracts, 2nd International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, Chisinau, 2013, p. 433-434.
- 26. Zinicovscaia I. Study of the interaction of metals (Hg, Cr, Zn, Ag, Au) with *Arthrobacter genera* and *Spirulina platensis*. Teză de doctor în științe chimice. Chișinău, 2013, 105 p.
- Boisseau P., Loubato B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. In: Comptes Rendus de L'Academie des Science 2011, hal-00598930.
- Frankel B.R. Biological permanent magnets.In: Hyperfine Interactions, 2003, 151, p.145-153.
- 29. Gupta A.K., Gupta M. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modied magnetic nanoparticles. In: Biomaterials, 2005, 26(13), p. 1565-1573.

- 30. Rai M., Duran N. Metal nanoparticles in microbiology. Springer-Verlag, 2011, 330 p.
- Goya G.F. et al. Static and magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. In: Journal of Applied Physics, 2003, 94(5), p. 3520-3528.
- Scherer C. et al. Ferrofluids: properties and applications. In: Brazilian Journal of Physics, 2005, 35(3A), p. 718-727.
- 33. Gupta A.K., Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. In: Biomaterials, 2005, 26(18), p. 3995-4021.
- 34. Yang Z. et al. Review of nanoparticles functionality and toxicity on the central nervous system. In: Journal of the Royal Society Interface, 2010, doi:10.1098/rsif.2010.0158.focus.
- 35. Lu A.-H. et al. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. In: Angewandte Chemie, 2007, 46, p. 1222-1244.
- 36. Zhang X.X. et al. Magnetic properties of fe nanoparticles trapped at the tips of the aligned carbon nanotubes. In: Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2001, 231, p. L9-L12.
- 37. Shin S. et al. Polymer-encapsulated iron oxide nanoparticles as highly effcient fenton catalysts. In: Catalysis Communications, 2008, 10, p. 178-182.
- Shahwan T. et al. Green synthesis of iron nanoparticles and their application as a fentonlike catalyst for the degradation of aqueous cationic and anionic dyes. In: Chemical Engineering Journal, 2011, 172, p. 258-266.
- Faraji Y. et al. Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications. In: Journal of the Iranian Chemical Society, 2010, 7(1), p. 1-37.
- 40. Berry C.C., Curtis A.S.G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. In: Journal of Physics D: Applied Physics, 2003, 36, p. R198-R206.
- 41. Byrne J.M. et al. Controlled cobalt doping in biogenic magnetite nanoparticles. In: Journal of the Royal Society: Interface, 2013, 10, 20130134.
- 42. Miaskowski A., Krawczyk A. Magnetic fluid hyperthermia for cancer therapy. In: Przeglad Elekrotechniczny (Elecrical Review), 2011, 87(12b), p. 125-127.
- 43. Cherukuri P. et al. Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. In: Advanced Drug Delivery Reviews, 2010, 62, p. 339-345.
- Fortin J.-P. et al. Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. In: Journal of American Chemical Society, 2007, 129, p. 2628-2635.
- 45. Lee J.W., Foote R.S. Micro and nano technologies in bioanalysis. methods in molecular biology. In: Human Press, 2009, p. 544.

- 46. Shubayev V.I. et al. Magnetic nanoparticles for theragnostics. In: Advanced Drug Delivery Reviews, 2009, 61, p. 467-477.
- Pankhurst Q.A et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. In: Journal of Physics D: Applied Physics, 2003, 36, p. R167-R181.
- Hwang Y. H., Lee D.Y. Magnetic resonance imaging using heparin-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for cell tracking in vivo. In: Quantitative Imaging in Medicine and Surgery, 2012, doi: 10.3978/j.issn.2223-4292.2012.06.03.
- 49. Gubin S.P. et al. Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties. In: Russian Chemical Reviews, 2005, 74(6), p. 489-520.
- 50. Forster H. et al. Experimental study of metal nanoparticle synthesis by an arc evaporation / condensation process. In: Journal of Nanoparticle Research, 2012, 14, p. 1-16.
- 51. Ishikawa Y. et al. Preparation of Fe-Pt alloy particles by pulsed laser ablation in liquid medium. În: Chemical Physics Letters, 2006, 428, p. 426-429.
- 52. Huang K.-C., Chou K.-S. Microstructure changes to iron nanoparticles during discharge/charge cycles. In: Electrochemistry Communications,2007, 9, p. 1907-1912.
- 53. Todaka Y. et al. Synthesis of fe-cu nanoparticles by mechanochemical processing using a ball mill. In: Materials Transactions,2002, 43(4), p. 667-673.
- Singh D.P., Srivastava O.N. Synthesis of copper nanoparticles by electrolysis of DNA utilizing copper as sacrificial anode. In: Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 7(6), 2007, p. 2105-2109.
- Murray R.W. Nanoelectrochemistry: metal nanoparticles, nanoelectrodes, and nanopores. In: Chemical Reviews, 2008, 108, p. 2688-2720.
- 56. Krishna Sailaja A. et al. Different techniques used for the preparation of nanopartciles using natural polymers and their application. In: International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2011, 3(2), p. 45-50.
- 57. Kim Y.H. et al. Synthesis of Cu nanoparticles prepared by using thermal decomposition of Cu-oleate complex. In: Molecular Crystals and Liquid Crystals, 2006, 445, p. 231-238.
- 58. Lee C.G. et al. Synthesis of high-purity silver colloids using a thermal decomposition method. In: Metals and Materials, 2008, 14(2), p. 189-192.
- Chou K., Ren C. Synthesis of nanosized silver particles by chemical reduction method. In: Materials Chemistry and Physics, 2000, 64, p. 241-246.
- Eastoe J. et al. Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles. In: Advances in Colloid and Interface Science, 2006, p.5-15.

- Kaneko T. et al. Control of nanoparticle synthesis using physical and chemical dynamics of gas-liquid interfacial non-equilibrium plasmas. In: Plasma Physics and Controlled Fusion, 2012, 54(124027), p. 1-6.
- 62. Mukherjee A. Biomimetics learning from nature. 2010. DOI: 10.5772/55321. http://www.intechopen.com/books/biomimetics-learning-from-nature (vizitat 16.05.2016).
- 63. Faivre D., Schler D. Magnetotactic bacteria and magnetosomes. In: Chemical Reviews, 2008, 108, p. 4875-4898.
- 64. Roh Y. et al. Extracellular synthesis of magnetite and metal-substituted magnetite nanoparticles. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2006, 6, p. 3517-3520.
- 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.
- Bazylinski D.A. et al. Controlled biomineralization of magnetite and greigite in a magnetotactic bacterium. In: Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(9), p. 3232-3239.
- 67. He W. et al. Biomineralization of iron phosphate nanoparticles in yeast cells. In: Material Science and Engineering C, 2009, 29, p. 1348-1350.
- Lefevre Ch.T. et al. Nonmagnetotactic multicellular prokaryotes from low-saline, nonmarine aquatic environments and their unusual negative phototactic behavior. In: Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(10), p. 3220-3227.
- Mahdavi M. et al. Green biosynthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles using seaweed (*Sargassum muticum*) aqueous extract. In: Molecules, 2013, 18, p. 5954-5964.
- 70. Miot J. et al. Iron biomineralization by anaerobic neutrophilic iron-oxidizing bacteria.In: Geochimica et Cosmochimica Acta, 2009, 73, p. 696-711.
- Perez-Gonzales T. et al. Magnetite biomineralization induced by *Shewanella oneidensis*.
 In: Geochimica et Cosmochimica Acta, 2010, 74, p. 967-979.
- Carvallo C. et al. Biogenic vs. abiogenic magnetite nanoparticles: A XMCD study. In: American Mineralogist, 2008, 93, p. 880–885.
- Chaudhuri S.K et al. Biogenic magnetite formation through anaerobic biooxidation of Fe(II). In: Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(6), p. 2844-2848.
- Bharde A.A., et al. Bacteria-mediated precursor-dependent biosynthesis of superparamagnetic iron oxide and iron sulfide nanoparticles. In: Langmuir. 2008, 24(11), p. 5787-94.

- 75. Posfai M. et al. Properties of intracellular magnetite crystals produced by *Desulfovibrio magneticus* strain rs-1. In: Earth and Planetary Science Letters, 2006, 249, p. 444-455.
- Zhu K., et al. Isolation and characterization of a marine magnetotactic *Spirillum axenic* culture qh-2 from an intertidal zone of the china sea. In: Research in Microbiology, 2010, 161, p. 276-283.
- 77. Kaul R.K. et al. Magnesium and iron nanoparticles production using microorganisms and various salts. In: Material Science-Poland, 2012, 30(3), p. 254-258.
- 78. Bharde A. et al. Extracellular biosynthesis of magnetite using fungi. In: Small. Wiley InterScience, 2006, 2(1), p. 135-141.
- 79. Arcon I. et al. Xas analysis of a nanostructured iron polysaccharide produced anaerobically by a strain of *Klebsiella oxytoca*. In: Biometals, 2012, DOI 10.1007/s10534-012-9554-6.
- Duca Gh. Homogeneous catalysis with metal complexes: fundamentals and applications.
 In: Springer Series in Chemical Physics: Berlin, 2012, 480 p.
- Duca Gh., Skurlatov Y., Sychev A. Redox catalysis and ecological chemistry. Publishing Centre M.S.U., Chisinau, 2002, 316 p.
- Gadd G.M. Microbial metal transformations. Journal of Microbiology, 2001, 39(2), p.83-88.
- 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. In: JINR Communications, E14-2011-75, p. 1-8.
- 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. In: European Conference on Neutron Scattering, Praga, Czech Republic, 2011, p. 306.
- Anghel L., Balasoiu M., Rogachev A., Kuklin A.I., Raikher Yu. Structural Investigations of Biogenic Ferrihydrite nanoparticles using ATSAS Program Moled Calculations. In: International Conference Dubna-Nano 2012, JINR, Dubna Russian Federation, Abstract book, p. 20.
- 86. Anghel L., Balasoiu M., Kovalev Yu.S., Ishchenko L. S., Raikher Yu. Polysaccharidecoated ferrihydrite nanoparticles isolated from a strain of Klebsiella oxytoca, In: International Summer School and Workshop on Complex and Magnetic Soft Matter Systems: physico – mechanical properties and structure, 3-7 Septembrie 2012, Alushta, Ucraina, Book of Abstracts, p. 46-47.

- 87. Anghel L., Balasoiu M., Kovalev Yu.S., Ishchenko L. Biogenic ferrihydrite nanoparticles for biomedical applications. In: XXII СОВЕЩАНИЕ по использованию рассеяния нейтронов в исследованиях конденсированного состояния, Гатчина, Roccuя, 2012, стр. 148.
- Stolyar S.V. et al. Iron-containing nanoparticles from microbial metabolism. In: Inorganic Materials, 2006, 42, p. 763-768.
- 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*, In: Journal of Physics: Conference series, 2012, 351 (1) 012005.
- Balasoiu M. et al. Structural investigation of biogenic ferrihydrite nanoparticles dispersion. In: Optoelectronics and Advanced Materials –Rapid Communications, 2010, 4(12), p. 2136-2139.
- 91. Anghel L., Balasoiu 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.
- 92. 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.
- Metzler D.E. Biochemistry. The chemical reactions of living cells. Second Edition. Elsevier Academic Press. 1973 p.
- Gavrilescu M. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. In: Engineering in Life Sciences, 2004, 4(3), p. 219-232.
- Sag Y., Kutsal T. Recent trends in the biosorption of heavy metals: a review. In: Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2001, 6, p. 376-385.
- 96. Vieira R.H.S.F., Volesky B. Biosorption: a solution to the pollution? In: International Microbiology, 2000, 3, p.17-24.
- 97. Gadd G.M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. In: Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2009, 84, p. 13-28.
- Wilke A. et al. Selective biosorption of heavy metals by algae. In: Environmental Biotechnology, 2006, 2(2), p.47-56.

- 99. Das K., Thiagarajan P. Mycobiosynthesis of metal nanoparticles. In: International Journal of Nanotechnology and Nanoscience, 2012, 1, p. 1-10.
- 100. Ahalya N. et al. Biosorption of heavy metals. In: Research Journal of Chemistry and Environment, 2003, 7(4), p. 71-79.
- 101. Benderliev K. Algae and cyanobacteria release organic chelators in the presence of inorganic fe(iii) thus keeping iron dissolved. In: Bulgarian Journal of Plant Physiology, 1999, 25(1-2), p. 65-75.
- 102. Veglio F., Beolchini F. Removal of metals by biosorption: review. In: Hydrometallurgy, 1997, 44, p. 301-316.
- Volesky B., Holan Z.R. Biosorption of heavy metals. In: Biotechnology Progress, 1995, 11, p. 235-250.
- 104. Wase J., Forster C. Biosorbents for metal ions. Taylor and Francis Ltd, 1997, 229 p.
- 105. Kotroba P. et al. Microbial biosorption of metals. Springer, Berlin, 2011, 329 p.
- 106. Fillis V.W. Design of a packed-bed fungal bioreactor. Master thesis, 2001.
- 107. Domozych D.S. et al. The cell walls of green algae: a journey through evolution and diversity. In: Frontiers in Plant Science: Plant Physiology, 2012, 3(82), p. 1-7.
- 108. Waldron K.J. et al. Metalloproteins and metal sensing. In: Nature, 2009, 460, p. 823-830.
- 109. Crichton R. Inorganic Biochemistry of iron ,etabolism: from molecular mechanisms to clinical consequences. 2nd ed, John Wiley&Sons, Chichester, 2001, 326 p.
- 110. Weiner S., Dove P.M. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. In: Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 2003, 54, p. 1-26.
- 111. Gilbert P.U.P.A. et al. The organic-mineral interface in biominerals. In: Mineralogy & Geochemistry, 2005, 59, p. 157-185.
- 112. Bazylinski D.A. et al. Modes of biomineralization of magnetite by microbes. In: Geomicrobiology Journal, 2007, 24, p. 465-475.
- 113. Yan L. et al. Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application. In: Microbiological Research, 2012, 167, p. 507-519.
- Bazylinski D.A., Frankel R.B. Magnetosome formation in prokaryotes. In: Nature Reviews Microbiology, 2004, 2, p. 217-230.
- 115. Chasteen D.N., Harrison P.M. Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. In: Journal of Structural Biology, 1999, 126, p. 182-194.
- 116. Barsanti L., Gualtieri G. Algae : anatomy, biochemistry, and biotechnology, Taylor and Francis Group, 2006, 291 p.

- 117. Castro L. et al. Biological synthesis of metallic nanoparticles using algae. IET Nanobiotechnology, 2012, p. 1-8.
- 118. Chen, J.G. et al. Effects of salinity changes on the growth of *Dunaliella salina* and its isozyme activities of glycerol-3-phosphate dehydrogenase. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(14), p. 6178-82.
- 119. Oren A. A hundred years of Dunaliella research: 1905–2005. In: Saline Systems 2005, doi:10.1186/1746-1448-1-2.
- 120. Pick U. in Salinity: Environment-Plants-Molecules (Eds. A. Läuchli, U. Lüttge), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2002, p. 97-112.
- Dipak S.P., Lele S.S. Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. In: Indian Journal of Biotechnology, 2005, 4, p. 476-483.
- Fakhry E.M., El Maghraby D.M. Fatty acids composition and biodiesel characterization of *Dunaliella salina*. In: Journal of Water Resource and Protection, 2013, 5, p. 894-899.
- 123. El Baz F.K. et al. Accumulation of antioxidant vitamins in *Dunaliella salina*. In: International Journal of Biological Sciences, 2002, 2(4), p. 220-223.
- 124. Katz A. et al. Salt-induced changes in the plasma membrane proteome of the halotolerant alga *Dunaliella salina* as revealed by blue native gel electrophoresis and nano-LC-MS/MS analysis. In: Molecular & Cellular Proteomics, 2007, 6, p. 1459-1472.
- 125. 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.
- 126. 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.
- 127. Muhaemin M. The initial adsorption of Pb²⁺ to *Dunaliella salina*, In: COASTDEV, 2006, 9(2), p. 97-105.
- 128. 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.
- 129. Akbarzadeh N., Shariati M. Aluminum remediation from medium by Dunaliella. In: Ecological Engineering, 2014, 67, p. 76-79.
- 130. Shafik M.A. Phytoremediation of some heavy metals by *Dunaliella salina*. In: Global Journal of Environmental Research, 2008, 2(1), p. 01-11.
- 131. Fisher M. et al. Iron uptake by the halotolerant alga Dunaliella is mediated by a plasma membrane transferrin. In: Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(28), p. 17553-17558.

- Paz Y. et al. A multicopper ferroxidase involved in iron binding to transferrins in *Dunaliella salina* plasma membranes. In: Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(12), p. 8658-8666.
- 133. Paz Y. et al. Effects of iron deficiency on iron binding and internalization into acidic vacuoles in *Dunaliella salina*. In: Plant Physiology 2007, 144, p. 1407-1415.
- 134. Parmley R.T. et al. Ultrastructural localization of nonheme celluar iron with ferrocyanide. In: Journal of Histochemistry Cytochemistry, 1978, 26, p. 729-741.
- 135. Lurie Yu. Handbook of Analytical Chemistry. Chemistry, 1971, 456 p. (în rusă)
- 136. Razmovski R., Sciban, M. Iron(III) biosorption by *Polyporus squamosus*. In: African Journal of Biotechnology, 2008, 7(11), p. 1693-1699.
- Foo K.F., Hameed B.H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. In: Chemical Engineering Journal, 2010, 156, p. 2–10.
- 138. Webber T.W., Chakkravorti R.K. Pore and solid diffusion models for fixed-bed adsorbers. In: AlChE Journal, 1974, 20, p. 228–238.
- 139. Ada K. et al. Adsorption of ramazol brilliant blue R using ZnO fine powder: Equilibrium, kinetic and thermodynamic modeling studies. In: Journal of Hazardous Materials, 2009, 165(1-3), p. 637-644.
- 140. Rudic V. ş a. Ficobiotehnologie–cercetări fundamentale și realizări practice. Chisinau 2007, 365 p.
- 141. Ben-Amotz A. in Membrane transport in plants (Eds. U. Zimmermann, J. Dainty), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1974, p. 95-100.
- 142. Duca Gh., Gladchi V. Lucrările practice la Metode fizice de cercetare. Chişinău, 2002, 140 p.
- 143. Bastert J. et al. Identification of dermatophytes by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: Mycoses, 1999, 42(9-10), p. 525-528.
- 144. Mayers J.J. et al. Rapid determination of bulk microalgal biochemical composition by Fourier-Transform Infrared spectroscopy. In: Bioresource Technology, 2013, 148, p. 215-220.
- 145. Gustafsson J.P. Visual MINTEQ ver. 3.0. 2010. Available at http://www2.lwr.kth.se/English/OurSoftware/vminteq/index.htm (vizitat 16.05.2016).
- 146. Andre M.N. et al. Iron(III) citrate speciation in aqueous solution. In: Dalton Transactions, 2009, 40, p. 8616-8625.
- 147. Vukosav P. et al. Revision of iron(III)-citrate speciation in aqueous solution. Voltammetric and spectrophotometric studies. In: Analytica Chimica Acta, 2012, 745, p. 85-91.

- 148. Al-Homaidan A.A. et al. Biosorption of copper ions from aqueous solutions by *Spirulina platensis* biomass. In: Arabian Journal of Chemistry, 2014, 7(1), p. 57-62.
- 149. Kratochvil D. et al. Removal of trivalent and hexavalent chromium by seaweed biosorbent.In: Environmental Science & Technology,1998, 32, p. 2693-2698.
- 150. Lee D.A., Goodfellow J.M. The pH-induced release of iron from transferrin investigated with a continuum electrostatic model, In: Biophysical Journal, 1998, 74, p. 2747-2759.
- 151. Chen N.X.C. et al. Biosorption of copper(II) and zinc(II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1. In: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2005, 46, p. 101–107.
- 152. Fisher M. et al. A structurally novel transferrin-like protein accumulates in the plasma membrane of the unicellular green alga *Dunaliella salina* grown in high salinities. In: Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(3), p. 1565-1570.
- 153. Lee K.O. et al. Copper (II) and nickel (II) sorption onto seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) waste biomass: equilibrium and mechanism studies. In: Middle-East Journal of Scientific Research, 2011, 9 (1), p. 84-89.
- 154. Avinash Mishra A. et al. Characterization of extracellular polymeric substances produced by micro-algae Dunaliella salina. In: Carbohydrate Polymers, 2011, 83, p. 852-857.
- 155. Shaw A.J. Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects, CRC Press, 1989, 330 p.
- 156. Li X. et al. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. In: Journal of Nanomaterials, 2011, 16 p.
- 157. Krumov N. et.al. Production of inorganic nanoparticles by microorganisms. In: Chemical Engineering and Technology, 2009, 32(7), p. 1026–1035.
- 158. Voet D., Voet J.G. Biochemistry 3rd edition. Wiley, 2004, 1616 p.
- 159. Eckenrotha B.E. et al. How the binding of human transferrin primes the transferrin receptor potentiating iron release at endosomal pH. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(32), p. 13089-13094.
- 160. Johanson B. Isolation of an iron-containing red protein from human milk. In: Acta Chemica Scandinavica, 1960, 14(2), p. 510-512.
- 161. Metz-Boutigue M.-H. et al. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. In: European Journal of Biochemistry, 1984, 145, p. 659-676.
- 162. Iyer S., Lonnerdal B. Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. In: European Journal of Clinical Nutrition, 1993, 47(4), p. 232-241.

- 163. Adlerova L. et al. Lactoferrin: a review. In: Veterinary Medicine-Czech, 2008, 53(9), p. 457-468.
- 164. Smith C.A. et al. Metal substitution in transferrins: the crystal structure of human copperlactoferrin at 2.1 - Å resolution. In: Biochemistry 1992, 31, p. 4527-4533.
- 165. Anghel, L., Erhan, R.V., Duca, Gh. A study of conformational dynamics of the human lactoferrin protein based on molecular dynamics simulations. In: 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.
- 166. Baker H.M., Baker E.N. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release. In: BioMetals 2004, 17, 209-216.
- 167. Guillen C. et al. Iron, lactoferrin and iron regulatory protein activity in the synovium; relative importance of iron loading and the inflammatory response. In: Annals of the Rheumatic Diseases, 1998, 57, p. 309-314.
- 168. Spadaro M. et al. Lactoferrin, a major defense protein of innate immunity, is a novel maturation factor for human dendritic cells. In: FASEB Journal, 2008, 28, p. 2747-2757.
- 169. Iigo M. et al. Anticarcinogenesis pathways activated by bovine lactoferrin in the murine small intestine. In: Biochemie. 2009, 91, p. 86-101.
- 170. Tang L. et al. Human lactoferrin stimulates skin keratinocyte function and wound reepithelialization. In: British Journal of Dermatology, 2010, 163, p. 38-47.
- 171. Sun, X.L. et al. Structure of recombinant human lactoferrin expressed in *Aspergillus awamori*. In: Acta Crystallographica, Section D, 1999, 55, p. 403-407.
- 172. Karthikeyan, S. et al. Structure of buffalo lactoferrin at 3.3 Å resolution at 277 K. In: Acta Crystallographica, Section D, 2000, 56, p. 684-689.
- 173. Moore, S.A. et al. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. In: Journal of Molecular Biology, 1997, 274, p. 222-236.
- 174. Kumar, P. et al. Crystal structure of equine apolactoferrin at 303 K providing further evidence of closed conformations of N and C lobes. In: Acta Crystallographica, Section D 2002, 58, p. 225-232.
- 175. Khan, J.A. et al. Protein intermediate trapped by the simultaneous crystallization process. Crystal structure of an iron-saturated intermediate in the Fe³⁺ binding pathway of camel lactoferrin at 2.7 Å resolution. In: Journal of Biological Chemistry, 2001, 276, p. 36817-36823.
- Humphrey W. et al. VMD: Visual Molecular Dynamics. In: Journal of Molecular Graphics, 1996, 14, p. 33-38.

- 177. Bernstein F.C. et al. The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. In: Journal of Molecular Biology, 1977, 112, p. 535-542.
- 178. Roberts, E. et al. MultiSeq: unifying sequence and structure data for evolutionary analysis.In: BMC Bioinformatics, 2006, 7, 382, p. 1-11.
- 179. Thompson, J.D. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. In: Nucleic Acids Research, 1994, 22(22), p. 4673-4680.
- Russell, R.B., Barton, G.J. Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels. In: Proteins, 1992, 14(2), p. 309-323.
- 181. Gordon, J.C. et al. H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules. In: Nucleic Acids Research, 2005 1(33), p. W368-W371.
- 182. Myers, J. et al. A simple clustering algorithm can be accurate enough for use in calculations of pKs in macromolecules. In: Proteins 2006, 63, p. 928-938.
- 183. Anandakrishnan, R. et al. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulation. In: Nucleic Acids Research, 2012, 40(W1), p. W537-W541.
- 184. Bashford, D., Karplus, M. pKa of ionizable groups in proteins: atomic detail from a continuum electrostatic model. In: Biochemistry, 1990, 29, p. 10219-10225.
- 185. Georgescu, R. et al. Combining conformational flexibility and continuum electrostatics for calculating pKas in proteins. In: Biophysical Journal, 2002, 83, p. 1731–1748.
- 186. Baker, N.A. et al. Implicit solvent electrostatics in biomolecular simulation. In: Leimkuhler, B., Chipot, C., et al. (eds), New Algorithms for Macromolecular Simulation, Vol. 49. Springer Berlin/Heidelberg, 2006, Chapter 15, p. 263–295.
- 187. Ponder, J.W., Case, D.A. Force fields for protein simulations. In: Advances in Protein Chemistry, 2003, 66, p. 27-85.
- 188. Baker N. et al. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 2001, 98, p. 10037-10041.
- 189. Tang C.L. et al. Calculation of pKas in RNA: on the structural origins and functional roles of protonated nucleotides. In: Journal of Molecular Biology, 2007, 366(5) p. 1475-96.
- 190. Feigin L.A., Svergun D.I. Structure analysis by small-angle X-ray scattering and neutron scattering. Plenum Press, New York, 1987, 335 p.

- 191. Svergun D.I. Small-angle scattering studies of macromolecular solutions. In: Journal of Applied Crystallography, 2007, 40, p. s10-s17.
- 192. James N.G., Mason A.B. Protocol to determine accurate absorption coefficients for iron containing transferrins. In: Analytical Biochemistry, 2008, 378(2), p. 202–207.
- 193. Barth A., Infrared spectroscopy of proteins. In: Biochimica et Biophysica Acta, 2007, 1767, p. 1073–1101.
- 194. **Anghel L.** Lactoferrin: Analysis of the structure profile. In: Chemistry Journal of Moldova, 2014, 9(2), p. 99-106.
- 195. Farnaud, S., Evans, R.W. Lactoferrin-a multifunctional protein with antimicrobial properties. In: Molecular Immunology, 2003, 40, p. 395-405.
- 196. Moguilevsky, N. et al. Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes. In: Biochemical Journal, 1985, 229, p. 353-359.
- 197. **Anghel L.** An investigation of the protonation states of human lactoferrin iron-binding protein. In: Chemistry Journal of Moldova, 2015, 10(1), p. 71-75.
- 198. Barth A., Zscherp C. What vibrations tell us about proteins. In: Quarterly Reviews of Biophysics 2002, 35 (4), p. 369-430.
- 199. 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.
- 200. van der Kamp M.W. et al. Biomolecular simulation and modelling: status, progress and prospects. In: Journal of the Royal Society Interface 2008, 5, p. S173-S190.
- Hansson T. et al. Molecular dynamics simulations. In: Current Opinion in Structural Biology 2002, 12, p. 190-196.
- Karplus M., McCammon J.A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. In: Nature Structural Biology 2002, 9(9), p. 646-652.
- 203. Hehre W.J. A guide to molecular mechanics and quantum chemical calculations, In: Wavefunction, Inc., Irvine, CA, 2003.
- 204. Schlick T. Molecular modeling and simulation. An interdisciplinary guide, Springer Science+Business Media, LLC, 2010, 162 p.
- 205. Car R., Parinello M. Unified approach for molecular dynamics and density-functional theory. In: Physical Review Letters 1985, 55(22), p. 2471-2474.
- 206. van Mourik T. First-principles quantum chemistry in the life sciences. In: Philosophical Transactions of the Royal Society A 2004, 362, p. 2653-2670.
- 207. Ramachandran K.I. et al.Computational chemistry and molecular modeling. Principles and applications. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008, 391 p.

- 208. Atkins P., Friedman R. Molecular quantum mechanics. Oxford University Press, 2005, 592 p.
- 209. Born M., Oppenheimer J.R. Zur quantentheorie der molekeln. In: Annalen der Physik (Leipzig) 1927, 84, p. 457-484.
- 210. Adcock S.A., McCammon J.A. Molecular dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins. In: Chemical Reviews 2006, 106(5), p. 1589-1615.
- 211. Alder B.J., Wainwright T.E. Studies in molecular dynamics. I. General method. In: Journal of Chemical Physics, 1959, 31(459), doi.org/10.1063/1.1730376.
- 212. van Gunsteren W.F., Mark A.E. On the interpretation of biochemical data by molecular dynamics. In: European Journal of Biochemistry 1992, 204, p. 947-961.
- 213. Meller J. Molecular dynamics. Encyclopedia of Life Sciences, 2001.
- 214. Brooks C.L. III. Molecular simulations of proteins, structure, dynamics and thermodynamics. In: Computer Modelling of Fluids Polymers and Solids, 1990, p. 289-334.
- 215. Berendsen H. et al. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. In: Computer Physics Communications, 1995, 91, p. 43-56.
- 216. Lindahl E. et al. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. In: Journal of Molecular Modeling, 2001, 7, p. 306-317.
- 217. van der Spoel D. et al. GROMACS: fast, flexible, and free. In: Journal of Computational Chemistry, 2005, 26, p. 1701-1718.
- Hess B., Kutzner C. et al. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. In: Journal of Chemical Theory and Computation, 2008, 4, p. 435-447.
- 219. Pronk S. et al. Gromacs 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. In: Bioinformatics 2013, 29(7), p. 845-854.
- 220. Hess B., et al. GROMACS user manual. Version 4.5.5., 2010, 352 p.
- 221. Norris, G.E. et al. Molecular replacement solution of the structure of apolactoferrin, a protein displaying large-scale conformational change. In: Acta Crystallographica, Section B, 47, p. 998-1004.
- 222. Guex N., Peitsch M. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. In: Electrophoresis 1997, 18, p. 2714-2723.
- 223. Dolinsky T. et al. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. In: Nucleic Acids Research, 2004, 32, p. W665-W667.

- 224. Dolinsky T. et al. PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. In: Nucleic Acids Research, 2007, 35, p. W522-W525.
- 225. Jorgensen, W.L. et al. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquid. In: Journal of American Chemical Society, 1996, 118, p 11225-11236.
- 226. Mason P. et al. Neutron diffraction and simulation studies of CsNO₃ and Cs₂CO₃solutions.
 In: Journal of American Chemical Society, 2006, 128, p. 15136-15144.
- 227. Lin W. et al. Molecular mechanics studies of model iron(III) transferrin complexes in vacuo and in aqueous solution. In: Inorganic Chemistry, 1994, 33, p. 884-890.
- 228. Jorgensen W. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. In: Journal of Chemical Physics, 1983, 79, p. 926-935.
- 229. Parrinello M., Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. In: Journal of Applied Physics, 1981, 52, p. 7182-7190.
- 230. Hess B. et al. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. In: Journal of Computational Chemistry, 1997, 18, p. 1463-1472.
- 231. Peterson N.A. et al. "Dilysine trigger" in transferrins probed by mutagenesis of lactoferrin: crystal structures of the R210G, R210E, and R210L mutants of human lactoferrin. In: Biochemistry, 2002, 3(41), p. 14167-14175.
- 232. Faber H.R. et al. Mutation of arginine 121 in lactoferrin destabilizes iron binding by disruption of anion binding: crystal structures of R121S and R121E mutants. In: Biochemistry, 1996, 25(46), p. 14473-14479.

ANEXE

Anexa 1. Act de implementare



INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE

IDNO 1006600031731

MD-2028 Republica Moldova, Chișinău, str.Academiei 1. Tel: (373 22)72 55 24, fax:(373 22)72 57 54, e-mail: microbiotech@imb.asm.md

nr. 91 23 mai 2016

ACT DE IMPLEMENTARE

Denumirea propunerii pentru implementare:

Metodă de testare a microorganismelor pentru identificarea capabilității de sinteză a nanoparticulelor metalice.

Autor: Anghel Lilia

Locul și perioada desfășurării lucrărilor de implementare

Institutul de microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei, laboratorul de Ficobiotehnologie,

Perioada 16-28 martie 2015.

Obiectul lucrărilor de implementare:

Implementarea metodei de testare a microorganismelor pentru identificarea capabilității de sinteză a nanoparticulelor metalice.

Conținutul lucrărilor de implementare și rezultatele obținute:

Tulpina microalgei verzi Dunaliellei salina a fost utilizată în cadrul cercetărilor de laborator. Studiile efectuate au permis stabilirea condițiile optime pentru realizarea procesului de acumulare a ionilor de fier 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 feric 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.

Concluzie:

Metoda de testare elaborată este reproductibilă și oferă informații veridice referitor la capacitatea organismelor ficologice de a realiza nanosinteza.

Director adjunct pent	ru stiintă	
dr., conf.cerc.	In the second se	L.CEPOI



Anexa 2. Diplome, certificate de participare



циплом

Научно-технический совет Лаборатории нейтронной физики им. И. М. Франка Объединенного института ядерных исследований на основании решения жюри конкурса научных, методических и прикладных работ ЛНФ за 2013 год присудил по разделу «Научные работы по физике конденсированных сред»

Лилии Васильевне Ангел

III премию

за цикл работ «Biogenetic nanoparticles produced by Klesiella oxytoca for medical applications: structure and properties investigation»

Директор ЛНФ

B.H. IIIBEIIOB

Председатель НТС ЛНФ

А.И. Франк

Дубна, 2014

September 20th, 2012

EuNPC2012 Program Committee Alaf Scholten, Chair

at the 2nd European Nuclear Physics Conference (EuNPC2012), 17-21 September 2012, Bucharest, Romania. "Molecular Dynamics Simulation of Diferric Human Lactoferrin",

Lilia Anghel JINR Dubna

The EuNPC2012 Poster Prize

Is awarded to

THE SRF

2nd European Nuclear Physics Conference

September 17-21, 2012, Bucharest, ROMANIA

for best poster presentation in Applications of Nuclear Physics, entitled

135

EMBL

EMBL Hamburg • Notkestr. 85 • 22603 Hamburg • Germany

Lilia Anghel Joint Institute for Nuclear Research Joliot-Curie 6 141980, Dubna, Russia Margret Fischer Senior Administrative Officer

T +49 40 89902-110 F +49 40 89902-149

margret@embl-hamburg.de

EMBL Hamburg c/o DESY Building 25A Notkestr. 85 22603 Hamburg Germany www.embl-hamburg.de

23rd October 2012

EMBO Practial Cource entitled Solution Scattering from Biological Macromolecules

I hereby certify that Lilia Anghel participated in the EMBO Practial Cource entitled Solution Scattering from Biological Macromolecules which was held here at the EMBL Hamburg Outstation from 17th October until 24th October.

Yours truly

Margret Fischer EMBL Hamburg Unit

12 Fiscl



European Molecular Biology Laboratory

Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire

Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie



RWTH Aachen - WWU Münster - IFF Forschungszentrum Jülich

Certificate

Hereby we certify that

Lilia Anghel

has successfully participated in the *JCNS Neutron Laboratory Course* of the Institute for Solid State Research at Forschungszentrum Jülich from September 06 to 17, 2010.

During 19 hours of lectures and 10 hours of exercises the following topics have been treated in detail:

- Neutron Sources
- A Neutron Primer
- Correlation Functions Measured by Scattering Experiments
- Symmetry of Crystals
- Applications of Neutron Scattering
- Polarized Neutron Scattering and Polarization Analysis
- Structural Analysis

- Magnetic and Lattice Excitations: Inelastic Neutron Scattering
- Macromolecules and Selfassembly
- Dynamics of macromolecules
- Correlated Electrons
- Surfaces, Interfaces and Thin Films Investigated by Neutron Reflectometry
- Nanomagnetism
- Access to Neutron Scattering Facilities

43 hours of experiments (including preparation and reporting) have been performed at the following instruments at the FRM II reactor in Garching:

- Three Axis Spectroscopy
- Powder Diffraction
- Single Crystal Diffraction
- Small Angle Scattering
- Ultra Small Angle Scattering
- Backscattering Spectroscopy

Jülich, 17.09.2010

Prof. Dr. Thomas Brückel

- Time-of-Flight Spectroscopy
- Spherical Polarimetry
- Neutron Spin Echo
- Resonance Neutron Spin Echo
- Neutron Reflectometry

Aull

Prof. Dr. Dieter Richter

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Numele. Prenumele:

Anghel Lilia

Semnătura:

Andre

Data:

08.06.2016

CURRICULUM VITAE LILIA ANGHEL

Data nașterii: 12/12/1986

Naționalitatea: Republica Moldova



Educație și fo	ormare:
2010-2014	Doctorandă
	Studii universitare de doctorat, specialitatea – 144.01. chimie-fizică
	Universitatea Academiei de Științe a Moldovei, str. Academiei, 3/2, Chișinău MD-2028,
2010-2013	Stagiu în domeniul Fizicii Starii Condensate
	Institutul Unificat de Cercetări Nucleare, str. Joliot-Curie, 6, 141980 Dubna, regiunea Moscovei,
	Federația Rusă, Laboratorul de Fizică a Neutronului, Departamentul de Fizică a Stării Condensate
2009-2010	Stagiu în domeniul Radiochimie
	Institutul Unificat de Cercetări Nucleare, str. Joliot-Curie, 6, 141980 Dubna, regiunea Moscovei,
	Federația Rusă, Laboratorul de Probleme Nucleare, Departamentul d Radiochimie
2008-2010	Master în Protecția mediului
	Specialitatea Chimie ecologică și protecția mediului
	Universitatea de Stat din Moldova, str. A. Mateevici, 60, MD-2009 Chișinău.
2005-2008	Licențiat în tehnologie chimică și biotehnologii
	Domeniul general de studii Tehnologie chimică și biotehnologii
	Specialitatea Tehnologie chimică
	Universitatea de Stat din Moldova, str. A. Mateevici, 60, MD-2009 Chișinău.
Domeniile de	Chimie fizică, elaborarea și optimizarea metodelor microbiologice de producere a
interes stiinti	nanoparticulelor împrăștierea la unghiuri mici cu raze-X și neutroni, chimia macromoleculară,
interes științi	simulări de dinamică moleculară.
Experiența p	rofesională:
2014 -	Cercetător științific
Prezent	Institutul de Chimie al Academiei de Științe a Moldovei, str. Academiei, 2, MD-2028 Chișinău,
	Republica Moldova (http://chem.asm.md/) Laboratorul de Chimie Cuantică Cinetică Chimică și
	Rezonanță Magnetică
2014 -	Expert Național al Republicii Moldova în cadrul Comitetului de Program Orizont 2020 direcția
Prezent	"Combaterea schimbarilor climatice, utilizarea eficienta a resurselor si materiei prime".
2010-2014	Cercetător științific stagiar
	Institutul de Chimie al Academiei de Științe a Moldovei, str. Academiei, 2, MD-2028 Chișinău,
	Republica Moldova (http://chem.asm.md/) Laboratorul de Chimie Cuantică Cinetică Chimică și
	Rezonanță Magnetică
2010-2013	Cercetător științific stagiar
	Institutul Unificat de Cercetări Nucleare, str. Joliot-Curie, 6, 141980 Dubna, regiunea Moscovei,
	Federația Rusă (http://jinr.ru/) Laboratorul de Fizică a Neutronului, Departamentul de Fizică a Stării
	Condensate (http://flnp.jinr.ru/)
2009-2010	Inginer
	Institutul Unificat de Cercetări Nucleare, str. Joliot-Curie, 6, 141980 Dubna, regiunea Moscovei,
	Federația Rusă (http://jinr.ru/) Laboratorul de Probleme Nucleare, Departamentul d Radiochimie (
	http://dlnp.jinr.ru/index.php/en/)
2008-2009	Cercetător științific stagiar
	Universitatea de Stat din Moldova, Centrul de Cercetare Științifică de Chimie Aplicată și Ecologică, str.
	A. Mateevici, 60, MD-2009 Chişinău, Republica Moldova (http://usm.md/)

Participări în proiecte științifice naționale și internaționale:

Executor în proiectul național "Studierea mecanismelor reacțiilor chimice, structurii electronice și proprietăților fizico-chimice ale unor compuși coordinativi ai metalelor de tranziție și a nanoparticulelor A_2B_6 ".

Executor în cadrul proiectului 95/17.02.2014-26 "Selective mechanism of the metal ions acquisition defined by the intermolecular interactions of transferrins" colaborare IUCN Dubna – IFIN-HH Romania 2013-2014.

Executor în proiectul național 11.817.08.22F "Studiul structurii geometrice si electronice ale noilor compusi coordinativi si nanomateriale, dinamicii spinilor si proceselor redox intru dezvoltarea producerii hidrogenului prin fotoliza apei". (2011-2014)

Executor în proiectul național 14.518.02.05A "Sinteza si studiul complecsilor polinucleari ai metalelor s-nd-4f ca catalizatori in procese chimice, substante poroase si precursori ai nanomaterialelor". (anul 2014)

Executor în cadrul proiectului 95/17.02.2014-26 "*The molecular machinery of Metalloproteins / Lactoferrin seen through Molecular Dynamics simulations and experimental studies*" - colaborare IUCN Dubna – IFIN-HH Romania 2013-2014.

Responsabil project IUCN, 81/18.02.2013-37 "Mechanistic aspects of the nanoparticles biosynthesis by several microorganisms studied by Molecular Dynamics simulations and experimental methods" colaborare IUCN Dubna – IFIN-HH Romania 2012-2013.

Responsabil project IUCN 81/06.02.2012-17, project "Mechanistic aspects of the nanoparticles biosynthesis by several microorganisms studied by Molecular Dynamics simulations and experimental methods" colaborare IUCN Dubna – Romania 2011-2012,

Responsabil project IUCN 81/06.02.2012-16, "Determination of concentration of iron containing nanoparticles and nanocomposites using 1,10-phenantroline method for SAXS and SANS investigations", colaborare IUCN Dubna – IFIN-HH Romania 2011-2012.

Seminare publice:

05.06.2013 Seminar în cadrul Institutului de Chimie AŞM, Chişinău "Simulări de Dinamică Moleculară ale mecanismului de legare a ionilor de fier de Lactoferină" (http://chem.asm.md/node/271)

24.04.2013 Seminar în cadrul Institutului Național de Fizică și Inginerie Nucleară - Horia Hulubei, Departamentul de Fizică Nucleară, Magurele, București, România, "*Molecular Dynamics simulations of human lactoferrin: Insights into the mechanism of iron binding*" (http://tandem.nipne.ro/~newpage/index.php?nr=29)

13.12.2012 Seminar în cadrul Institutului Național de Fizică și Inginerie Nucleară - Horia Hulubei, Departamentul de Fizică Nucleară, Magurele, București, România, "*Molecular dynamics simulations and experimental studies of diferric human lactoferrin*" (http://tandem.nipne.ro/~newpage/index.php?nr=31&id=107)

Lucrări publicate în reviste științifice și teze ale comunicărilor științifice naționale și internaționale:

7 lucrări publicate și 12 teze ale comunicărilor științifice

Premii, mențiuni, disticții, etc.

- 2015 Premiul Institutului Unificat pentru Cercetări Nucleare, Dubna, Federația Rusă, în domeniul Cercetărilor în Fizică Experimentală
- 2014 Diploma Academiei de Științe a Moldovei "pentru rezultate frumoase în activitatea profesională cu ocazia Zilei Științei"
- **2013** Diploma Laboratorului de Fizică a Neutronului " I. M. Frank" al Institutului Unificat pentru Cercetări Nucleare, Dubna, Federația Rusă
- **2012** Certificat de participare în cadrul evenimetului științific "*EMBO Practical Course on Solution Scattering from Biological Macromolecules*", Hamburg, Germania
- **2012** Diploma pentru cea mai bună prezentare de poster în domeniul Aplicații ale Fizicii Nulceare în cadrul Conferinței " 2nd European Nuclear Physics Conference", București, România
- **2010** Certificat de participare în cadrul evenimetului științific "14th Neutron Laboratory Course in Julich and Garching"

Activități în cadrul colegiilor de redacție ale revistelor științifice, etc: Redactor tehnic, revista Chem. J. Mold.

Limba maternă: Limba română

Alte limbi străine cunoscute: Limba rusă, Limba franceză, Limba engleză.

Date de contact: str. Academiei, 3; MD-2028 Chişinău, Republica Moldova tel: 022 72 97 61 email: anghel.lilia@gmail.com